



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Influencia de polimorfismos en receptores tipo Toll (TLRs) y receptores para Inmunoglobulina G (FcγRs) en la susceptibilidad a tuberculosis en población del estado de Veracruz.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Viridiana Sujhey Hernández Bazán

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Enrique Ortega Soto
Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)

Comité Tutorial:

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)
Dra. Martha Estela Pérez Rodríguez
(Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas)

MÉXICO, D. F. mayo, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Enrique Ortega, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, con el apoyo económico de CONACYT (proyecto 178803) y FOMIX VERACRUZ-CONACYT (proyecto 109253). Recibí una beca por parte de CONACYT.

Agradezco a la M. en C. Beatriz Sánchez su asesoría y a la M. en IBB. Claudia A. Garay Canales por su apoyo técnico, a lo largo del desarrollo de este trabajo. Agradezco al Dr. Javier Fuentes de los Servicios de Salud del Estado de Veracruz su apoyo para el reclutamiento de participantes y la recolección de las muestras.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química por aceptarme y brindarme una formación académica desde la licenciatura y ahora una maestría.

A mis padres y a mi hermano, por su apoyo moral, económico y confianza, los cuales siempre me han impulsado a realizar y cumplir con este y muchos otros objetivos en mi vida.

Al Dr. Enrique Ortega por haberme dado la confianza y oportunidad de llevar acabo estos estudios de posgrado en su laboratorio. A los demás integrantes de este laboratorio (Clau, Diana, Lupe, Sergio, Natalia, Ofelia, Andrea, Enrique Jr, Ale, Ileana, Joel y a la Sra. Raquel) ya que por muy simple que haya sido en algunos casos, todos colaboraron a que el proyecto fuera posible.

A mis grandes amigos Pau, Sam, Viri zu, Laura, Piby y Carlos, quienes me han apoyado desde lo social hasta lo académico.

A Josué, quien en la amistad desde la licenciatura y más en estos últimos dos años me ha apoyado y acompañado, en lo bueno y en lo malo, en lo académico, en lo familiar y en lo personal.

¡Gracias a todos!

Índice

Resumen-----	7
Marco Teórico -----	9
Tuberculosis-----	9
Receptores involucrados en el reconocimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -----	12
Receptores tipo Toll (TLRs)-----	17
Receptores para Inmunoglobulina G-----	21
Antecedentes-----	24
Planteamiento del problema-----	26
Hipótesis-----	27
Objetivo-----	28
Objetivos particulares -----	28
Metodología-----	29
Población de estudio-----	29
Muestras sanguíneas y aislamiento de ADN-----	30
Genotipificación de los polimorfismos en TLRs y FcγRs-----	31
Equilibrio de Hardy-Weinberg-----	33
Asociaciones genotípicas y haplotípicas -----	34
Desequilibrio de Ligamiento-----	34
Resultados-----	35
Equilibrio de Hardy-Weinberg-----	35
Influencia de los polimorfismos en la susceptibilidad a tuberculosis -----	38
Desequilibrio de ligamiento-----	44

Discusión -----	46
Conclusiones-----	51
Anexo I. Equilibrio de Hardy-Weinberg-----	52
Anexo II. Razón de Momios (OR) -----	53
Anexo III. Preparación de soluciones-----	55
Referencias-----	57

Resumen

Aproximadamente dos terceras partes de la población mundial ha sido infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, aunque no todos los individuos infectados desarrollan la sintomatología de la enfermedad. El contacto con personas enfermas es la principal forma de contagio, y dependiendo de factores ambientales y genéticos, el individuo contagiado puede o no desarrollar la enfermedad. A nivel celular, el reconocimiento de la micobacteria se da a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los receptores tipo Toll (TLRs), lectinas tipo-C y receptores tipo NOD, los cuales inducen la activación de las células y la producción de citocinas pro-inflamatorias para combatir la infección.

En el presente trabajo se investigó si polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en *TLR1* (Asn248Ser), *TLR2* (Arg753Gln), *TLR4* (Asp299Gly, Thr399Ile), *TLR6* (Ser249Pro), *TLR10* (Ala163Ser, Val298Ala), *FCGR1IA* (Arg131His) y *FCGR1IIIA* (Val158Phe), tienen alguna influencia sobre la susceptibilidad de un individuo a desarrollar tuberculosis, mediante un estudio de casos y controles, comparando las frecuencias de cada uno de los polimorfismos entre una muestra de la población sana y una muestra de la población enferma o que haya contraído la enfermedad, de habitantes del estado de Veracruz, debido a que este estado se encuentra dentro de los primeros diez estados con mayor incidencia, con 28 nuevos casos por cada 100 mil habitantes en el año 2011.

El análisis se realizó comparando las frecuencias de los distintos genotipos y haplotipos que se encontraron en la población de estudio, por medio del cálculo de la razón de momios (OR). Para los polimorfismos estudiados en *TLR4* (Asp299Gly; Thr399Ile), los genotipos heterocigotos para ambos SNPs tienen una mayor frecuencia en la población sana, lo que llevo a que se identificaran como un factor de protección, con un OR=0.183 para el genotipo DG299 y un OR=0.304 para el genotipo TI399, ambos con significancia estadística ($p=0.0018$ y $p=0.02$ respectivamente).

En el estudio por haplotipos, los polimorfismos se analizaron agrupados de acuerdo al cromosoma en el que se encuentran los genes. En el caso de *TLR4* que se encuentra en el cromosoma 9, el haplotipo conformado por las variantes ancestrales (D299/T399) resulta en un factor de riesgo con un OR=3.19 ($p=0.011$) y por el contrario el haplotipo conformado por los polimorfismos (G299/I399) es un factor protector con un OR=0.32 ($p=0.027$). Los polimorfismos en *TLR1*, *TLR6* y *TLR10* se encuentran en el cromosoma 4, en este caso se encontró un haplotipo conformado por las variantes *TLR6* 249P, *TLR10* 163S, *TLR10* 298I y *TLR1* 248S, como factor protector (OR=0.4, $p=0.036$).

El análisis de desequilibrio de ligamiento (LD), muestra que los polimorfismos en *TLR10* A163S y *TLR10* I298V tienen un alto LD entre sí (mayor a 95%), al igual que los polimorfismos en *TLR4* T399I y *TLR4* D299G.

Los polimorfismos en *TLR4* asociados a ser un factor de protección (*TLR4* 299G y 399I) se han relacionado con una menor inducción de la activación de NF- κ B, lo cual pudiera favorecer la eliminación de la micobacteria ya que en ensayos *in-vitro* se ha observado que la inhibición de este factor de transcripción resulta en un aumento en apoptosis y autofagia en la célula infectada, los cuales son mecanismos que favorecen la muerte de la micobacteria dentro de macrófagos infectados.

Marco Teórico

Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad que ha afectado a la humanidad desde hace mucho tiempo, pues se ha encontrado evidencia de este padecimiento en momias egipcias (2000-3000 a. C.) y también se ha encontrado mencionada en antiguos escritos chinos y babilónicos.

El principal agente causal de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* que tiene otros seis miembros: *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* y *M. canetti*. Todos los miembros del complejo son patógenos y pueden causar la enfermedad, sin embargo, a pesar de que sus genomas son muy parecidos, cada especie tiene propiedades fenotípicas características, las cuales dan lugar a que tengan un rango distinto de hospederos, por ejemplo *M. bovis*, *M. pinnipedii* y *M. caprae* infectan principalmente a mamíferos domesticados o salvajes aunque también pueden tener como hospedero al humano, mientras que *M. africanum* causa la enfermedad en humanos en ciertas regiones africanas y *M. microti* infecta solo a ratones de campo [1], [2].

Se calcula que aproximadamente dos terceras partes de la población mundial ha sido infectada por el patógeno, sin embargo solo entre el 5% y el 10% desarrollará la enfermedad activa. Entre los individuos que no desarrollan sintomatología solo aproximadamente el 70% es capaz de erradicar por completo a la micobacteria, en el resto de las personas la micobacteria permanece en el organismo en un estado latente o durmiente en el que no hay replicación de la bacteria. Sin embargo, cuando alguna circunstancia afecta de manera negativa al sistema inmune de la persona (infección por VIH, enfermedades autoinmunes o cáncer), la micobacteria puede volver a replicarse y provocar la tuberculosis activa [1], [3]. En el año 2010 hubo una incidencia de 8.5 a 9.2 millones de casos de tuberculosis en el mundo, lo que es equivalente a unos 128 casos por cada 100 000 personas [4].

La principal sintomatología causada por la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, incluye tos crónica con esputo sanguinolento, fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso. La transmisión de la enfermedad se produce cuando una persona infectada con tuberculosis pulmonar expulsa, al toser o estornudar, micobacterias dentro de pequeñas gotas de saliva las cuales son inhaladas por personas que se encuentren cerca del individuo afectado.

Los bacilos llegan a los pulmones en donde los macrófagos alveolares interactúan con la micobacteria a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) y la fagocitan. Este primer encuentro puede llevar a la destrucción del patógeno por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, la acidificación del fagosoma y la fusión del fagosoma con lisosoma [1], [5]. En este aspecto, se ha observado la participación de una molécula la cual es crucial para la acidificación del fagosoma, se trata de NRAMP1 o SLC11A1 (Proteína del macrófago asociada a resistencia natural), ya que en macrófagos de ratones con el gen mutado no se logra la maduración del fagosoma conteniendo *M. bovis* y con ello se impide la fusión con lisosomas y la destrucción de la bacteria [6], [7].

Sin embargo, dependiendo de la virulencia de la micobacteria, hay casos en los que la micobacteria es capaz de evadir esta destrucción, modulando el tráfico y maduración del fagosoma e impidiendo la fusión fagosoma-lisosoma. La micobacteria también puede facilitar su diseminación por medio del sistema de secreción tipo VII (ESXII), el cual promueve la necrosis de la célula infectada (con la consiguiente liberación de bacterias intracelulares) y el reclutamiento de macrófagos que fagocitan las bacterias liberadas, las cuales pueden proliferar dentro del macrófago infectado. Otra forma en que la micobacteria puede evitar su destrucción es inhibiendo la apoptosis de la célula hospedera para así prolongar la sobrevivencia de las células infectadas y con esto aumentar el número de micobacterias intracelulares antes de ser liberadas tras la muerte del macrófago. Estos mecanismos generales de evasión y modulación de la respuesta inmune permiten que la micobacteria sobreviva y pueda multiplicarse exponencialmente dentro de macrófagos [1], [3].

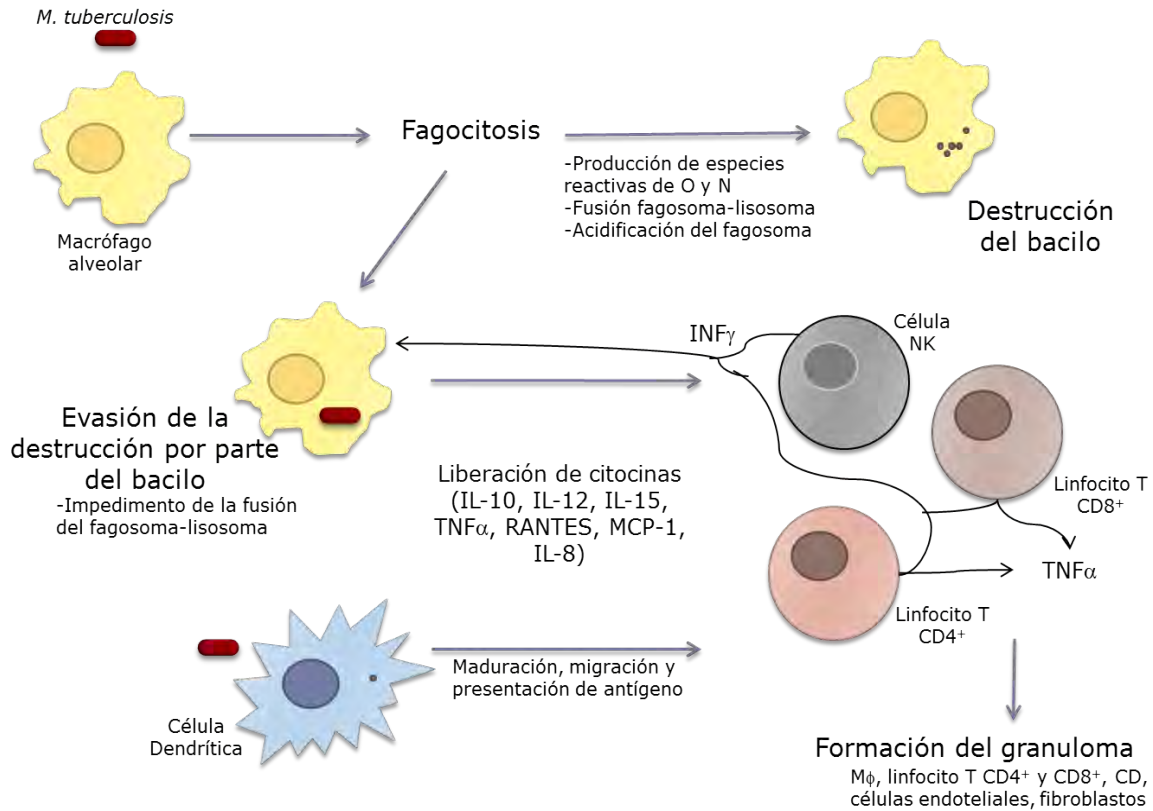


Figura 1. Esquema general de la respuesta inmune frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Los macrófagos alveolares fagocitan a la micobacteria, la cual puede ser eliminada aunque en la mayoría de los casos hay un impedimento de la fusión fagosoma-lisosoma por parte de la micobacteria, la cual desencadena una serie de eventos en donde los macrófagos liberan citocinas que atraen a linfocitos T (CD4+ y CD8+) que han sido activados por células dendríticas. Finalmente se da la formación del granuloma, que es un agregado de distintos tipos celulares, el cual puede contener la replicación de la micobacteria y favorecer su eliminación o provocar que ésta entre en un estado de latencia.

Las micobacterias que sobreviven a la destrucción por parte de los macrófagos, se multiplican dentro de estos, lo cual provoca la muerte del macrófago con la consecuente liberación de micobacterias. El macrófago infectado libera citocinas (IL-10, IL-12, IL-15, TNF α , RANTES, MCP-1, IL-8) al medio externo, lo cual atrae más células inmunes al sitio de infección. Dentro de las células atraídas están las células dendríticas, las cuales también fagocitan a los bacilos, maduran y migran a los nódulos linfáticos para activar

linfocitos T naive (tanto CD4⁺ como CD8⁺). Los linfocitos efectores producto de esta activación, migran de vuelta hacia el sitio de la infección guiados por las quimiocinas liberadas por los macrófagos. Al llegar al sitio de infección liberan IFN- γ el cual favorece la muerte de los macrófagos infectados y activa a los macrófagos que recién lleguen al sitio de infección para que puedan destruir eficientemente a la micobacteria.

Al continuar la infección más células son reclutadas al sitio de infección (linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos y células endoteliales) y la acumulación de éstas da lugar a la formación del granuloma, el cual limita la diseminación de la micobacteria creando un microambiente de hipoxia, un nivel de pH bajo, presencia de óxido nítrico y monóxido de carbono, al mismo tiempo que continúa la destrucción de macrófagos infectados por medio de los linfocitos T.

Estas condiciones llevan a los bacilos a un estado de latencia, en el cual dejan de multiplicarse y forman una estructura tipo espora (observada en *M. bovis* BCG, *M. marinum* y *M. smegmatis*). En este estado la micobacteria puede mantenerse y habitar en el granuloma durante el resto de la vida del hospedero. Sin embargo, la infección puede reactivarse en caso de una inmunosupresión, como pudiese ser la infección por VIH o enfermedades autoinmunes, en cuyo caso puede tener lugar el crecimiento exponencial y diseminación de micobacterias con la consecuente aparición de la sintomatología de la enfermedad [1], [3], [8], [9].

Receptores involucrados en el reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis*

Las células del sistema inmune innato expresan receptores que son capaces de interactuar y reconocer a un gran número de microorganismos patógenos. Estos receptores, denominados receptores de reconocimiento de patrones o PRRS, reconocen Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) o también denominados Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (MAMPs), que son estructuras conservadas y esenciales para la sobrevivencia de bacterias, hongos, virus, etc. [10].

Mycobacterium tuberculosis infecta preferencialmente a las células fagocíticas profesionales en los pulmones, como macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas [8]. El reconocimiento de la micobacteria involucra a varios tipos de PRRs, como los receptores tipo-Toll (TLRs), los receptores tipo NOD, lectinas tipo C, dectina-1 y DC-SIGN (Figura 2) [5].

La interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con TLRs lleva a la activación de los fagocitos, aunque se requiere de otras interacciones para que se lleve a cabo la ingestión de la micobacteria. El reconocimiento por medio de TLRs lleva la activación y translocación de diversos factores de transcripción como NF- κ B al núcleo de la célula, con lo cual comienza la síntesis de diversas citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 β e IL-12).

Diversos glicolípidos que se encuentran en la membrana de las micobacterias como lipoarabinomananas (LAM), lipomananas (LM), fosfatidilinositolmanósido (PIM), glicoproteínas micobacterianas de 19-kDa y 38-kDa y lipoproteínas triaciladas o diaciladas, son reconocidas por los heterodímeros de TLR2/TLR1 o TLR2/TLR6, pues en experimentos realizados en células RAW 264.7 transfectadas con mutantes negativas de TLR2 no se observa el mismo nivel de activación de NF- κ B que con la variante silvestre del TLR2 al estimular con la micobacteria completa o con lipoarabinomanana purificada. En otro estudio, al estimular con PIM purificado se obtiene una respuesta específica para TLR2 en la línea celular 3E10 transfectada con TLR2 [11]–[13].

El TLR4 reconoce a la proteína de choque térmico 60/65 (Hsp 60/65), la cual es una proteína secretada por *Mycobacterium tuberculosis*; y se ha demostrado que en células provenientes de ratones TLR4 $^{-/-}$ no hay activación de NF- κ B tras la estimulación con la Hsp65 purificada [14], [15]. Hay varios estudios que demuestran la importancia de TLR4 en la infección con tuberculosis; entre ellos, se ha demostrado que en ratones deficientes de TLR4 hay una menor producción de TNF α , y se ha visto que en células que expresan una mutante dominante negativa del receptor hay una menor activación de NF- κ B [3], [12].

Otro TLR que participa en el reconocimiento de micobacterias es el TLR9, el cual reconoce ADN bacteriano (motivos CpG sin metilar). La participación de este receptor se ha evidenciado usando ratones TLR9^{-/-}, los cuales tienen una menor sobrevivencia al ser infectados con la micobacteria [16], también se ha observado que la falta de este receptor lleva a una menor expresión de IL-12p40 en respuesta a la infección, con respecto a la cepa silvestre [17].

Otro tipo de PRR involucrado en el reconocimiento de *Mycobacterium tuberculosis* son los receptores tipo-NOD (NLRs). Algunos de estos receptores al activarse, median el ensamblaje de inflamasomas, complejos supramoleculares que inician una serie de señalizaciones que llevan al reclutamiento y activación de la caspasa-1, la cual es capaz de procesar citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β e IL-18). Otro tipo de NLRs (NOD1, NOD2, NLRP10, NLRX1, NLRC5 Y CIITA) activan NF-kB, MAPK cinasas, IRFs (factores reguladores del interferón), en lugar de la activación de caspasas[18].

De los NLRs, el receptor que se ha observado involucrado en la infección por micobacterias es NOD2: en estudios en células HEK-293 transfectadas con NOD2 y un reportero de luciferasa para NF-kB, se observa una activación al estimular con N-glicolil MDP (N-glicolilmuramildipéptido) que se encuentra presente en la pared celular de micobacterias [19]. En otro estudio, se demostró que en células mononucleares aisladas de sangre periférica de individuos con una inserción en el gen de NOD2 que causa un cambio en el marco de lectura (3020 $insC$), se tiene una menor producción de TNF al estimular con la lipoproteína de 19kDa y MDP [20], demostrando la importancia de la activación de NOD-2 durante el reconocimiento de la micobacteria.

El receptor de manosa (MR, CD206) es una lectina tipo-C, la cual tiene dominios para reconocer carbohidratos presentes en los patógenos. Está altamente expresado en macrófagos alveolares, que son las primeras células que entran en contacto con *Mycobacterium tuberculosis* al momento de la infección. La estimulación del receptor de manosa con lipoarabinomana con residuos de manosa terminal (Man-LAM) induce la expresión de citocinas tipo

Th2 (IL-4, IL-13) e inhibe la producción de IL-12. Aparte de Man-LAM, otro glicolípido de micobacterias, el fosfatidilinositolmanósido (PIM), también es ligando del receptor de manosa. La interacción de la micobacteria con el receptor de manosa induce la fagocitosis de la bacteria, aunque la fusión fagosoma-lisosoma es limitada [3], [21].

El nivel de manosilación de glicoproteínas entre las distintas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* también contribuye al reconocimiento de estas por las lectinas tipo-C; la cepas virulentas con menor manosilación en su superficie no son fagocitadas a través del receptor de manosa y se utilizan otros receptores como CR3 (receptor de complemento tipo-3) después de que se osoniza la micobacteria. La cepa H37Rv, una cepa de *M. tuberculosis* muy comúnmente utilizada en estudios experimentales, tiene en su superficie componentes altamente manosilados, y es reconocida por el receptor de manosa. Los diferentes componentes en la superficie de las cepas virulentas regulan la expresión de citocinas dando como resultado un microambiente propicio para el crecimiento intracelular de la micobacteria [3], [22], [23].

En células dendríticas, la molécula DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin, una lectina tipo C con afinidad por la molécula de adhesión ICAM-3) es un receptor que funciona como PRR y como molécula de adhesión, y participa durante la migración de células dendríticas. Este receptor tiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos, capaz de reconocer a Man-LAM y lipomananas, y la interacción de este receptor con Man-LAM previene la maduración de la célula dendrítica [24]. El receptor DC-SIGN también puede reconocer al α -glucano, un polisacárido capsular de *Mycobacterium tuberculosis*. La unión de este polisacárido a DC-SIGN estimula la expresión de IL-10, lo cual requiere de la acetilación de NF- κ B [25]. El α -glucano de *Mycobacterium smegmatis* (considerada como una micobacteria no patógena) también es reconocido por Dectina-1, un receptor que cuenta con un dominio extracelular de reconocimiento de carbohidratos y un dominio ITAM intracelular, y que es expresado en macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y algunos subtipos de linfocitos T. En macrófagos derivados de médula ósea de ratón, al bloquear

a Dectina-1 se obtiene una menor expresión de TNF- α después de infectar con *Mycobacterium smegmatis* [3], [26].

En un estudio en células mononucleares humanas aisladas de sangre periférica se demostró que al bloquear a los receptores Dectina-1 y TLR4 se obtuvo una menor expresión de IL-17A al tratar a las células con micobacterias muertas por calor (*Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37Rv) [27]. Dectina-1 es uno de los principales receptores involucrados en direccionar una respuesta hacia un perfil Th17[27].

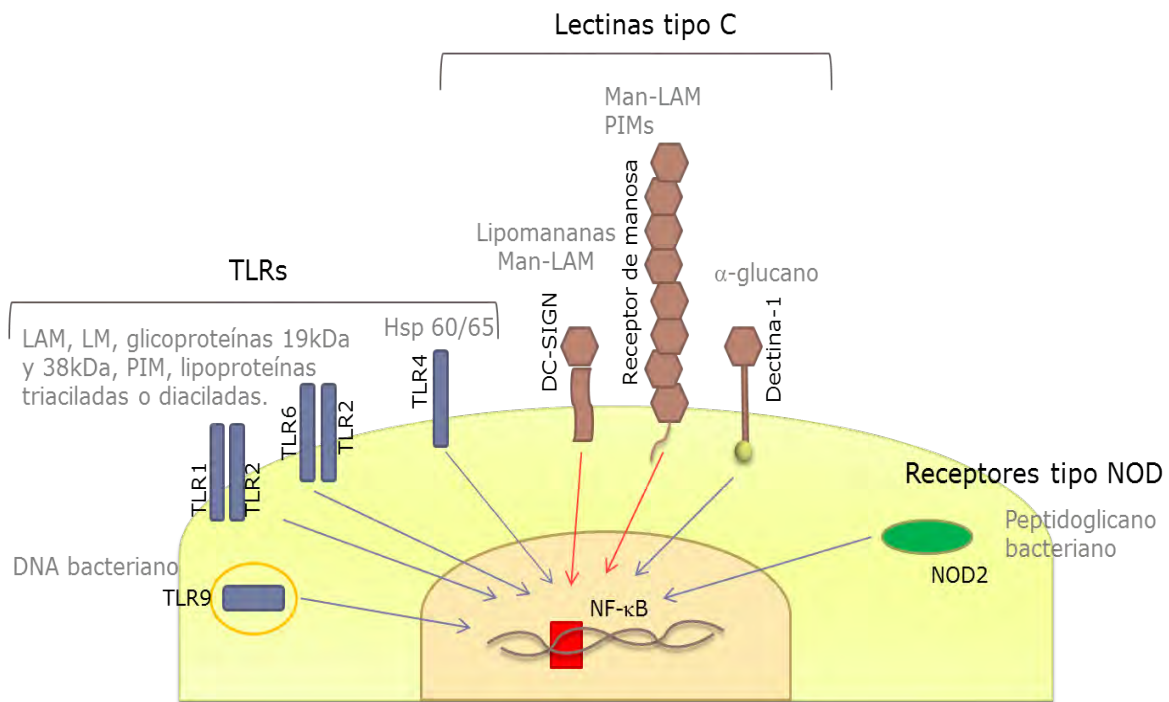


Figura2. Receptores que participan en el reconocimiento de micobacterias.

El reconocimiento de la micobacteria lleva a la activación de vías de señalización que finalizan en la activación y translocación del factor de transcripción NF- κ B (las flechas azules indican activación pro-inflamatoria de la vía, mientras que las flechas rojas indican una activación anti-inflamatoria).

En gris se denominan a los ligandos presentes en micobacterias y en negro a su respectivo receptor [modificado de 2].

LAM: lipoarabinomanana, LM: lipomanana, gp: glicoproteína, PIM: fostatidilinositolmanósido, MAN-LAM: lipoarabinomanana con residuos de manosa terminal, Hsp: proteína de choque térmico.

Receptores tipo Toll (TLRs)

Los receptores tipo Toll (TLRs) son un grupo muy estudiado dentro de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Los TLRs tienen una estructura extracelular que contiene repetidos ricos en leucina, que es la región encargada de mediar el reconocimiento de los PAMPs; una región transmembranal y una porción citosólica que contiene un dominio homólogo al receptor Toll/receptor de interleucina-1 (TIR), el cual es esencial para desencadenar las vías de señalización después del reconocimiento del ligando. Se han identificado hasta ahora 10 TLRs distintos, que son capaces de reconocer diferentes PAMPs (Tabla 1). Algunos TLRs se encuentran en la superficie de la célula, como son TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10, mientras que otros TLRs se encuentran en vesículas intracelulares y en general son capaces de reconocer ácidos nucleicos, como son TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 [28], [29].

Tabla 1. Reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por TLRs.

Patógeno	PAMPs	TLRs
Bacterias	Lipopolisacárido (LPS)	TLR4
	Lipoproteína, peptidoglicano, lipoarabinomannana, ácido lipoteicoico	TLR2/1, TLR2/6
	Flagelina	TLR5
	DNA	TLR9
	RNA	TLR7
Virus	DNA	TLR9
	RNA	TLR3, TLR7, TLR8
	Estructuras proteicas	TLR2, TLR4
Hongos	Zimosan, β -glucano	TLR2, TLR6
	Manana	TLR2, TLR4
	DNA	TLR9

Los TLRs que se encuentran en la membrana celular pueden formar heterodímeros con otros TLRs distintos presentes en la membrana, o bien homodímeros entre dos TLRs iguales. El TLR2 es capaz de formar heterodímeros con TLR1 o con TLR6, de tal manera que esto ayuda a que tengan una mayor cantidad de ligandos que puedan reconocer. El heterodímero TLR2/1 es capaz de reconocer lipopéptidos triacilados de bacterias Gram-negativas, mientras que el heterodímero TLR2/6 reconoce lipopéptidos diacilados de bacterias Gram-positivas [30]. El TLR4 reconoce proteínas de origen viral como la proteína F del virus sincitial respiratorio (RSV), oligosacáridos como el ácido hialurónico, y lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas. Para la interacción del LPS con TLR4, el LPS liberado por la bacteria se asocia con la proteína unidora de lipopolisacárido (LBP) que se encuentra presente en el torrente sanguíneo; este complejo se une a CD14 y el LPS se transfiere a MD-2, una proteína que se encuentra asociada a la porción extracelular de TLR4, esto induce la dimerización de TLR4 lo que desencadena la señalización. El TLR5 se expresa en células de epitelios, en monocitos y en células dendríticas inmaduras; su ligando es la flagelina, que es el principal componente proteico de los flagelos bacterianos [29]-[31]. TLR10 es capaz de formar homodímeros y heterodímeros con TLR1 y TLR2; aún no se han encontrado ligandos de este TLR, sin embargo en estudios hechos por medio de programas computacionales se encontró un posible ligando que sería Pam₃CSK₄ (lipopéptido sintético Pam₃-Cis-Ser-Lis₄) para los heterodímeros de TLR10 con TLR2, mientras que cuando TLR10 forma un homodímero o un heterodímero con TLR1 se encontró como posible ligando a PamCisPamSK₄ (lipopéptido diacilado) [32], [33].

Los TLRs que se encuentran en vesículas intracelulares reconocen ácidos nucleicos de distinto tipo según el TLR involucrado. El TLR3 reconoce dsARN (ARN de doble cadena) que se genera después de una infección por virus con genoma de ARN. TLR7 y TLR8 son esenciales para reconocer ssARN (ARN de cadena sencilla) provenientes de virus como el virus de la influenza o el virus sincitial respiratorio. El TLR7 se expresa en células dendríticas plasmocitoides, mientras que el TLR8 se encuentra en células dendríticas convencionales. El

TLR9 reconoce ADN de cadena sencilla proveniente de bacterias, este ADN debe contener motivos CpG sin metilar para que pueda ser reconocido como ligando, también hay virus de ADN como herpes simplex y citomegalovirus cuyo ADN contiene estos motivos CpG [29].

La unión del ligando a los TLRs desencadena una vía de señalización, la cual da inicio a una respuesta inflamatoria ante la infección por un patógeno. Esta activación de TLRs estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 o TNF α (factor de necrosis tumoral alfa), o también puede llevar a la producción de interferón tipo I (IFN α e IFN β). Dependiendo de la célula (macrófagos, monocitos o distintos tipos de células dendríticas) y el TLR involucrado, se sigue la vía de señalización que llevará a la producción de las distintas citocinas, al culminar en la activación de distintos factores de transcripción como NF- κ B, e IRFs (Figura 3) [28]–[30], [34].

La interacción de los ligandos con los heterodímeros u homodímeros de TLRs induce el reclutamiento de una o varias moléculas adaptadoras que contienen dominios TIR como MyD88, TRIF, TIRAP o TRAM para dar comienzo a la cascada de señalización. De estas moléculas adaptadoras, MyD88 es la molécula adaptadora por excelencia, ya que es utilizada por todos los TLRs, a excepción de TLR3, el cual solo puede reclutar a TRIF.

Generalmente, las vías de transducción de señales por TLRs son dependientes de MyD88 y llevan a la activación de NF- κ B y con esto a la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, mientras que las vías que dependen de TRIF conducirán a la activación de IRFs y con esto a la síntesis de IFN-tipo I. Sin embargo, hay células que pueden activar IRFs a pesar de ser una vía MyD88 dependiente, como sucede en monocitos, de igual manera a través de TLR4 se puede activar tanto a NF- κ B como a IRFs [28], [34] (Figura 3).

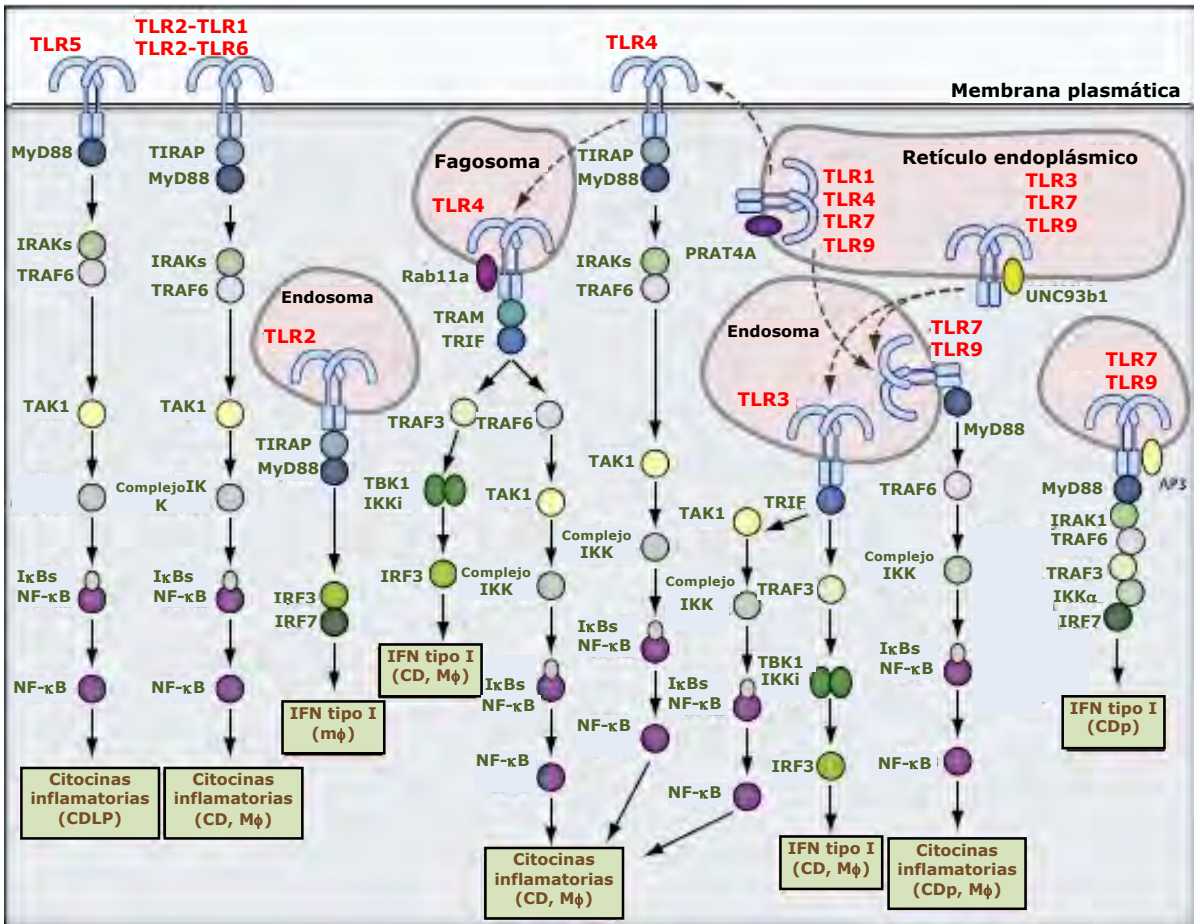


Figura 3. Vía de señalización de TLRs

Las vías de señalización varían de acuerdo al TLR y al tipo celular involucrado, como macrófagos (Mφ), células dendríticas (CD), células dendríticas plasmocitoides (CDp), células dendríticas de la lámina propia (CDLP) o en monocitos (mφ). Al reconocer a su ligando o PAMP correspondiente, se induce un cambio conformacional del TLR lo que permite las interacciones homofílicas o heterofílicas con otros TLRs y así reclutar a las proteínas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM para iniciar la cascada de señalización y activar otras proteínas para llegar finalmente a la activación de los factores de transcripción NF-κB, IRF3 o IRF7 e inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias (NF-κB) y de IFN tipo I (IRF3 e IRF7). Adaptado de [28].

Receptores para Inmunoglobulina G

Los receptores para la región Fc de las inmunoglobulinas conjuntan las respuestas humorales con las actividades celulares en el sistema inmune. Los receptores para inmunoglobulina G (Fc γ Rs) son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se han descrito tres clases de receptores para IgG: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) (Figura 4). Prácticamente todos los leucocitos (monocitos, macrófagos, granulocitos, linfocitos, células NK, células dendríticas) y las plaquetas expresan al menos un tipo de receptores Fc γ Rs. La interacción de complejos inmunes con los receptores para IgG puede desencadenar diversas funciones efectoras como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis, estallido respiratorio y la liberación de citocinas u otras moléculas pro-inflamatorias [35].

Existen tres genes (*FCGR1A*, *FCGR1B* y *FCGR1C*) que codifican para tres isoformas de receptores de IgG de la clase I, Fc γ RIa, Fc γ RIb y Fc γ RIc. Sin embargo, solo el receptor Fc γ RIa es una proteína funcional. Su estructura consta de tres dominios de inmunoglobulina en su porción extracelular, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática. Se expresa constitutivamente en macrófagos y monocitos y en menor cantidad en polimorfonucleares. El receptor completo es un complejo entre una cadena α codificada en el gen *FCGR1A* involucrada en la unión de IgG, y un homodímero de cadenas FcR γ [36].

La cadena FcR γ es la responsable de iniciar la señalización resultante de la agregación del Fc γ RI inducida por complejos inmunes. Para iniciar la cascada de señalización es esencial el motivo de activación ITAM (motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptores) en la porción citoplasmática de la cadena FcR γ . Tras la agregación de los receptores, el motivo ITAM es fosforilado por cinasas de la familia Src. La fosforilación de los ITAMs genera sitios a los que se une la cinasa Syk, la cual se activa y puede fosforilar a otros sustratos disparando la cascada de señalización que conduce a los procesos antes mencionados (fagocitosis, ADCC, liberación de citocinas, etc.).

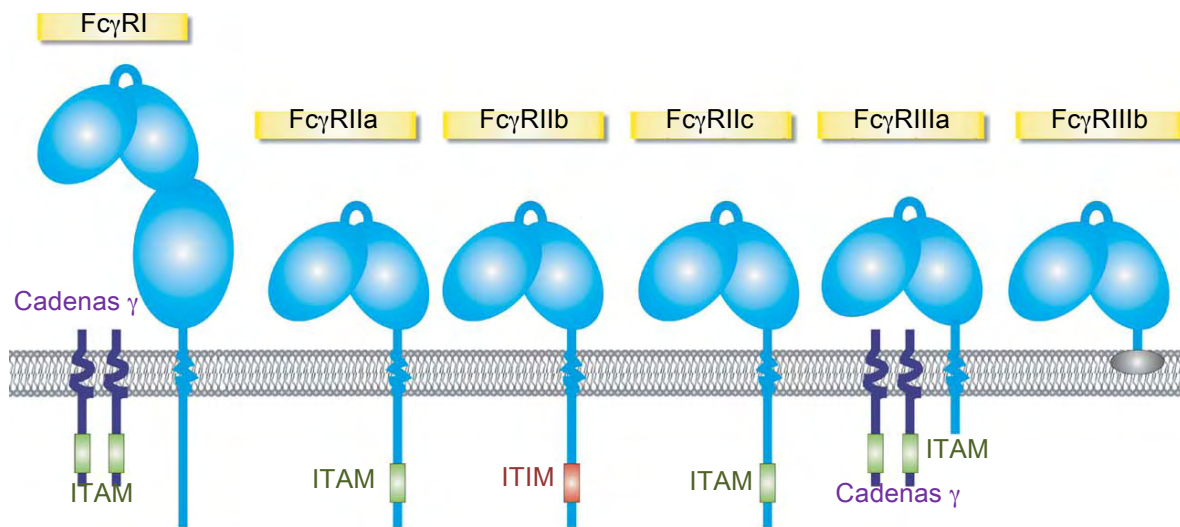


Figura 4. Representación esquemática de los Fc γ Rs

Todos los Fc γ Rs tienen dos dominios de inmunoglobulina en su porción extracelular, excepto el Fc γ RI cuya porción extracelular tiene tres dominios. El Fc γ RI y el Fc γ RIIIa se asocian a cadenas Fc γ que tienen motivos de activación (ITAM), los receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIIc no se asocian a cadenas Fc γ y tienen en su cola citoplasmática un motivo ITAM (rectángulo verde). Por el contrario, el receptor Fc γ RIIb tiene un motivo ITIM (rectángulo rojo) en su cola citoplasmática. El Fc γ RIIIb no tiene dominio transmembranal ni cola citoplasmática, se encuentra anclado a la membrana por un glicosil-fosfatidilinositol (ovalito gris) [36].

Dentro de los receptores clase II para IgG (Fc γ RII) hay tres isoformas: Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, y Fc γ RIIc. Estos receptores se expresan en monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos B, plaquetas, células dendríticas, etc. Constan de una sola cadena polipeptídica que en su porción extracelular contiene dos dominios de inmunoglobulina que interactúan con la molécula de IgG, una porción transmembranal y una cola citoplasmática en donde se encuentran los motivos para la transducción de señales. Los receptores Fc γ RIIa y Fc γ RIIc son receptores activadores al igual que Fc γ RI, ya que en su porción citoplasmática tienen un motivo ITAM; el receptor Fc γ RIIb no se expresa en la mayoría de la población debido a un polimorfismo que codifica para un codón de paro. Cuando el polimorfismo está ausente se expresa la proteína, lo cual se ha visto asociado con la enfermedad de púrpura trombocitopénica idiopática.

En el caso de Fc γ RIIb, hay dos isoformas: Fc γ RIIb1 y Fc γ RIIb2, generadas por el procesamiento alternativo del mRNA. La isoforma IIB1 contiene un inserto de 19 aminoácidos en la región citoplasmática, que no está presente en la forma IIB2. Las dos isoformas tienen funciones inhibitorias debido a que en su cola citoplasmática tienen un motivo ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina de inmunoreceptores), el cual se fosforila y es capaz de inhibir la activación desencadenada por receptores que señalicen por la vía de ITAMs. La fosforilación del motivo ITIM involucra la activación de fosfatasas (SHIP-1 en linfocitos B y SHIP en células cebadas y linfocitos B). La isoforma b2 es capaz de internalizar complejos inmunes pequeños, al contrario de la isoforma b1.

La clase III de los receptores para IgG, se forma por dos genes que codifican para dos proteínas, el Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb. Ambos receptores tienen en su porción extracelular dos dominios de inmunoglobulina muy similares entre sí, y difieren en el resto de su estructura. El Fc γ RIIIa tiene una región transmembranal y una cola citoplasmática, y al igual que el Fc γ RI, se asocia a homodímeros de cadenas FcR γ en monocitos y macrófagos aunque también se puede asociar con homodímeros de cadenas ζ o heterodímeros γ/ζ en células NK (células asesinas naturales). Al entrecruzarse el Fc γ RIIIa, se fosforilan las cadenas γ o ζ por cinasas de la familia Src. A los ITAMs fosforilados se les asocia la cinasa Syk, la cual se activa y fosforila a PI-3K (fosfoinositol 3-cinasa), PLC γ 1 y PLC γ 2. El Fc γ RIIIb no tiene un dominio transmembranal y por lo tanto tampoco una cola citoplasmática, y se encuentra anclado a la membrana por glicosil-fosfatidilinositol. El Fc γ RIIIb se expresa en leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos). El receptor puede interactuar con CR3, Fc γ RIIa o con alguna otra molécula señalizadora para poder ejercer sus funciones.

Las distintas clases de receptores tienen diferente afinidad de unión para la inmunoglobulina G: el Fc γ RI tiene una alta afinidad y es capaz de unir IgG monomérica, Fc γ RIIa y Fc γ RIIIb son de baja afinidad y unen complejos de IgG, mientras que el Fc γ RIIIa tiene una afinidad media y puede unir tanto IgG monomérica como en complejos [37], [38].

La participación de los Fc γ Rs durante la infección por *M. tuberculosis* ha sido muy poco estudiada, pues al tratarse de una bacteria intracelular no se les ha conferido un papel importante en la respuesta contra la micobacteria. Sin embargo, hay algunos estudios en los que se ha analizado su papel de manera indirecta. En un modelo KO para la cadena γ (Fc γ -/-) se encontró una mayor susceptibilidad, así como una mayor expresión de IL-10 en comparación con la cepa silvestre [39]. En otro estudio al estimular a los Fc γ Rs con perlas recubiertas con IgG, se tiene una mejor dirección de la fusión fagosoma-lisosoma en células RAW 274.7 infectadas con el bacilo *Calmette-Guérin* (BCG) [40].

Por otra parte también se han identificado la expresión de anticuerpos IgG2a en contra de la proteína de 38kDa de *M. tuberculosis* y se han probado anticuerpos monoclonales contra la arabinomanana y lipoarabinomanana, los cuales confieren una mejor sobrevida a la infección [41], [42].

Antecedentes

Los TLRs son receptores de gran importancia para el inicio de la respuesta inmune en contra de *Mycobacterium tuberculosis*. Se conocen diversos polimorfismos de un solo nucleótido que afectan a la estructura primaria de este tipo de receptores, lo que puede provocar un cambio en la funcionalidad del receptor, por lo que estos polimorfismos pueden tener influencia sobre la eficiencia de la respuesta contra micobacterias.

Se han analizado varios polimorfismos de distintos TLRs, y se han encontrado algunas asociaciones entre la presencia de ciertos alelos y una mayor susceptibilidad a adquirir tuberculosis. Así por ejemplo, el polimorfismo en R753Q en TLR2 se vio asociado a una mayor susceptibilidad en un estudio realizado en Turquía, pero esta misma asociación no fue encontrada en dos estudios realizados en poblaciones asiáticas debido a la baja frecuencia de este polimorfismo en estas poblaciones. El cambio de aminoácido que resulta del polimorfismo se localiza en el dominio TIR y se sabe que afecta la señalización a través de este receptor [43]–[45]. En el mismo TLR2 existe otro polimorfismo que consiste en una delección (nucleótidos -196 a -174) dentro del promotor de TLR2. La presencia de esta delección se encontró asociada con una mayor susceptibilidad a tuberculosis en poblaciones caucásicas y africanas [46].

Para TLR1, se han estudiado los polimorfismos N248S e I602S, los cuales también se encontraron asociados con una mayor susceptibilidad a tuberculosis en un estudio realizado en población hispana. Para TLR6 se han estudiado varios polimorfismos, entre ellos los polimorfismos S249P, V427A y V465I, en poblaciones áfrico-americana e hispana. A estos polimorfismos también se les asoció con un mayor riesgo para adquirir tuberculosis. En un estudio realizado en población caucásica e hispánica se encontraron polimorfismos de TLR10 asociados a un incremento en la susceptibilidad a la enfermedad [47], [48]. Así mismo, en TLR8 y TLR9 también se han encontrado varios polimorfismos asociados a una mayor susceptibilidad a padecer tuberculosis [46], [49].

Dos polimorfismos presentes en TLR4 han sido ampliamente estudiados debido a que se encuentran ligados entre sí, D299G y T399I; a estos polimorfismos se les ha relacionado como factor de riesgo para enfermar de tuberculosis, aunque en otros estudios no se encontró esta asociación a una mayor susceptibilidad debido a las diferencias de las frecuencias entre las distintas poblaciones [50], [51], [52].

Hay polimorfismos presentes en otras moléculas importantes en la respuesta contra *Mycobacterium tuberculosis* como DC-SIGN (receptor tipo lectina C específico de células dendríticas), TIRAP (proteína adaptadora con un dominio TIR), IFN γ , receptor para IFN γ , IL-1 β , receptor para IL-12, IL-10, TNF α y su receptor, algunos alelos de moléculas del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), NRAMP1 (SLC11A1), etc., a los cuales se les ha asociado un riesgo para adquirir la enfermedad en distintas poblaciones [3], [53]–[56].

Asimismo, se han identificado polimorfismos en los receptores para IgG que están asociados a una mayor susceptibilidad a distintas enfermedades, aunque no se ha analizado su posible influencia en la susceptibilidad a tuberculosis. Se han identificado polimorfismos en receptores para IgG asociados a una mayor susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes como Lupus eritematoso sistémico (SLE), con el polimorfismo R131H del Fc γ RIIa. Este cambio resulta en mayor afinidad por la IgG2. La presencia de Arginina (R) en esta posición se ha visto asociada a protección contra la forma severa de malaria, y en otro estudio se observó un curso más severo de SARS asociado a la presencia de este alelo [57], [58]. El receptor para IgG con actividad inhibitoria, el Fc γ RIIb, tiene un polimorfismo (I232T) que se localiza en la región transmembranal y que también se ha asociado a una mayor susceptibilidad para desarrollar SLE. Otro polimorfismo responsable de ocasionar cambios en la funcionalidad de uno de los receptores para IgG es el polimorfismo en V158F en Fc γ RIIIa, el cual provoca un cambio en la afinidad del receptor por IgG1 e IgG3, siendo la afinidad mayor cuando se tiene valina (V); la presencia de fenilalanina (F) en esta posición se ha relacionado también con una mayor susceptibilidad a desarrollar Lupus eritematoso sistémico [59].

Planteamiento del Problema

La tuberculosis es una enfermedad de gran importancia a nivel mundial debido al elevado número de casos nuevos que se presentan cada año, por lo que es importante conocer los distintos factores que predisponen a mayor susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. Estos factores pueden ser ambientales (condiciones de vivienda, clima, tabaquismo), factores sociales (nivel socio-económico, vivir junto a individuos infectados o tener contacto directo con ellos) o factores genéticos (polimorfismos que alteren la funcionalidad de proteínas involucradas en la defensa del organismo).

En México, específicamente en el Estado de Veracruz, la tuberculosis mostró una prevalencia de aproximadamente 2012 casos nuevos en 2011, lo que resulta en una prevalencia relativamente alta. Es por ello que la población de este estado puede ser considerada para el estudio de factores genéticos, como polimorfismos que pudieran influir en el desarrollo de la enfermedad.

Hipótesis:

Los polimorfismos de un solo nucleótido (*TLR1* N248r, *TLR2* R753Q, *TLR4* D299G/T399I, *TLR6* S249P y *TLR10* A163S/V298A, *FCGRIIA* R131H y *FCGRIIIA* V158F) en los genes que codifican para distintos receptores tipo Toll (TLRs) y para los receptores para IgG (FcγRs) que participan en la respuesta inmune, están asociados a diferencias en la susceptibilidad poblacional a desarrollar tuberculosis, en el estado de Veracruz.

Objetivo:

Comparar las frecuencias de algunos polimorfismos de un solo nucleótido presentes en los genes codificantes para TLRs y FcγRs, entre un grupo de personas enfermas de tuberculosis y un grupo de personas control (sin tuberculosis), para determinar si los polimorfismos influyen en la susceptibilidad para adquirir o desarrollar tuberculosis en la población del Estado de Veracruz.

Objetivos particulares:

1. Análisis de los polimorfismos de un solo nucleótido de *TLR1* (N248S), *TLR2* (R753Q), *TLR4* (D299G; T399I), *TLR6* (S249P) y *TLR10* (A163S; V298A), así como *FCGRIIA* (R131H) y *FCGRIIIA* (V158F), a partir de leucocitos obtenidos de sangre periférica de individuos del estado de Veracruz.
2. Determinar la frecuencia de polimorfismos en TLRs y FcγRs en la población del Estado de Veracruz.
3. Determinar la influencia de los polimorfismos en la susceptibilidad a tuberculosis en la población del estado de Veracruz.
4. Analizar el desequilibrio de ligamiento (LD) de los polimorfismos que se encuentran en el mismo gen.

Metodología

Población de estudio

Se realizó un estudio de casos y controles, para lo cual se obtuvieron muestras de sangre periférica de un total de 281 enfermos de tuberculosis y 572 controles sanos, habitantes en el estado de Veracruz. Las muestras fueron obtenidas de 3 jurisdicciones sanitarias: Coatzacoalcos (32 enfermos y 72 controles), Poza Rica (156 enfermos y 300 controles) y Veracruz (93 enfermos y 200 controles). El tamaño de muestra se estimó considerando un 10% de frecuencia alélica en la población enferma y un 5% en población sana, con un poder estadístico del 80% y un nivel de confianza del 95%.

Todos los participantes firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio, después de que se les explicó el diseño del estudio y se les explicó que su participación consistiría en donar una muestra de 4 mL de sangre venosa y responder a las preguntas de un cuestionario. Mediante el cuestionario se seleccionó a aquellos individuos que fuesen VIH-negativos, que no padeciesen de alguna enfermedad autoinmune ni padezcan diabetes mellitus y que tengan ancestría mexicana (padres y abuelos mexicanos).

Todos los participantes fueron captados con la ayuda de los Servicios de Salud del Estado de Veracruz y en el caso de los enfermos, la tuberculosis debió de estar confirmada por cultivo o sintomatología sugestiva y radiografía de tórax.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Investigación en Seres Humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y por la Comisión Estatal de Investigación, Bioética y Bioseguridad de los Servicios de Salud de Veracruz.

Muestras sanguíneas y aislamiento de ADN

De cada participante se obtuvo por punción venosa, una muestra de 2 a 4mL de sangre, que se extrajeron directamente a tubos con EDTA (BD Vacutainer).

Para extraer el ADN genómico se realizó inicialmente la lisis de los eritrocitos, colocando la sangre completa en un tubo Falcon de 50mL y agregando TTS 10mM (ver Anexo III) hasta completar un volumen de 10mL. Se agitaron y en seguida se centrifugó a 3000rpm (Sorvall Legend MACH 1.6) por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1mL de TTS 10mM, una vez resuspendido se adicionó más TTS hasta un volumen final de 10mL, se volvieron a agitar y a centrifugar a 3000rpm por 5 min. Se repitió el procedimiento de lisis de eritrocitos hasta que se obtuviera un botón blanco (leucocitos), el cual se congeló a -20°C en un tubo eppendorf de 1.5mL hasta continuar el procedimiento (de 24h hasta una semana como máximo).

Se descongeló el botón y se agregaron 500µL de NaCl 5mM, se resuspendió el botón y en seguida se adicionan 30µL de SDS al 10%. Se agitaron los tubos en vortex (VortexGenie2) por 30 segundos para lisar los leucocitos. Posteriormente se adicionaron 200µL de NaCl saturado, se volvió a agitar en vortex por 30 segundos y se centrifugó a 14000 rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf) por 10min, a una temperatura de 15°C.

Al término de la centrifugación, se recolectó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 1.5mL, para proceder a realizar la extracción de las proteínas agregando 500µL de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 14000rpm por 10min a 15°C. Al concluir la centrifugación se obtienen dos fases, la fase acuosa (fase superior) se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5mL, el cual contenía 500µL de isopropanol (grado HPLC, pureza \geq 99.8%) para precipitar el ADN. Se mezcló suavemente, invirtiendo los tubos varias veces y se centrifugaron a 14000rpm por 15min a 15°C.

Se retiró el sobrenadante y el botón se lavó con 300 μ L de etanol al 70%, agitando brevemente en el vortex. Se centrifugaron a 14000rpm por 10 min a 15°C y se desechó el sobrenadante; de ser necesario se realizó otro lavado con etanol al 70% siguiendo los pasos anteriores. El botón de ADN se dejó secar por aproximadamente 5 min o hasta que la mayoría del etanol remanente se hubiese evaporado y se resuspendió en un volumen de 100 μ L de agua inyectable (dependiendo del tamaño del botón, algunos se resuspendieron en volúmenes mayores o menores de agua).

El ADN de cada muestra se cuantificó en un Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) midiendo su absorbancia a 260nm (ácidos nucleicos), 280nm (proteínas) y 230nm (cantidad de sales), esperando una relación entre A_{260}/A_{280} mayor o igual a 1,8 y una relación A_{260}/A_{230} mayor o igual a 1,7.

Una vez cuantificadas las muestras se prepararon diluciones de éstas a una concentración de 30ng/ μ L (para un volumen final de 25 μ L o 50 μ L para facilitar el pipeteo en las muestras de mayor concentración) y se almacenaron a 4°C hasta llevar a cabo las reacciones posteriores para la genotipificación de polimorfismos. El restante ADN del stock se congeló a -20°C y en caso de ser requerido se prepararon nuevas diluciones a partir de éstos.

Genotipificación de los polimorfismos en TLRs y Fc γ Rs

El análisis de los polimorfismos se realizó mediante el uso de sondas Taqman (SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems), en donde se hace una discriminación alélica por medio de dos sondas (oligonucleótidos) marcadas con distintos fluoróforos (VIC y FAM), de tal manera que dependiendo del alelo o alelos presentes en la muestra de ADN podrán hibridar y amplificarse la señal de uno o de ambos fluoróforos específicos.

Los polimorfismos en TLRs y Fc γ Rs que se analizaron en la muestra de la población fueron los siguientes:

Tabla 2. Características de los polimorfismos en TLRs y FCGRs

dbSNP	Gen	Posición (genoma)	Posición (ARNm)	Cambio AA	Alelo	Sitio en proteína
rs4833095	TLR1	chr4: 38799710	742	248 N/S	A/G	Extracelular
rs5743708	TLR2	chr4:154845767	2257	753 R/Q	A/G	Citoplasmática
rs4986790	TLR4	chr9:119515123	8551	299 D/G	A/G	Extracelular
rs4986791	TLR4	chr9:119515423	8851	399 T/I	C/T	Extracelular
rs5743810	TLR6	chr4:38506745	745	249 S/P	A/G	Extracelular
rs11466649	TLR10	chr4:38453120	496	163 A/S	A/C	Extracelular
rs11466651	TLR10	chr4:38452715	891	298 V/I	C/T	Extracelular
rs1801274	FCGR2A	chr1:161479745	550	131 R/H	C/T	Extracelular
rs396991	FCGR3A	chr1:161514542	663	158 V/F	G/T	Extracelular

A partir de las diluciones de las muestras de ADN se llevó a cabo la discriminación alélica por PCR en Tiempo Real. Para esto, en placas de 96 pozos de 0.1mL para PCR en tiempo real (MicroAmp Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems) se colocaron las muestras de ADN problema (90 muestras como máximo por placa), 3 controles para cada genotipo (dependiendo del polimorfismo a analizar) y 3 controles negativos (sin templado). Para cada placa se preparó una mezcla de los reactivos a excepción del ADN, en un tubo eppendorf de 1.5mL, suficiente para una placa de 96 pozos tomando en cuenta una cantidad extra para facilitar el pipeteo:

	Volumen para 100rxn
Universal Taqman Master Mix con UNG (Applied Biosystems)	375 μ L
Ensayo SNP Genotyping (Applied Biosystems)	12.5 μ L
Agua inyectable	512.5 μ L

Una vez que se tiene la mezcla de los reactivos para la reacción de PCR en tiempo real se colocaron en cada pozo 9 μ L de la mezcla anterior y 1 μ l de ADN (dilución a 30 μ g/ μ L). Se cubrió la placa con una película adhesiva (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) y se centrifugó 1min a 1000rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf) a 4°C para mezclar y eliminar las burbujas que pudieran interferir en la lectura de la reacción.

Una vez cerrada y centrifugada la placa se mantuvo a 4°C hasta dar inicio a la reacción de PCR que se llevó a cabo en el equipo Real-Time PCR 7500 Fast (Applied Biosystems). El programa de temperaturas que se utilizó fue el siguiente:

Temperatura	Tiempo	# ciclos
60°C	1min	1
50°C	2min	1
95°C	10min	40
60°C	1min	
60°C	1min	1

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Con los datos obtenidos se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para cada polimorfismo, con lo que se determinó si las frecuencias se encuentran dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg para la población control (sanos).

Se realizaron los cálculos descritos en el anexo I para determinar si la muestra seleccionada se encuentra en equilibrio, si en la prueba de χ^2 el valor obtenido es menor a 3.84 ($p < 0.05$), se encuentra dentro del equilibrio. Los cálculos se realizaron para cada polimorfismo analizado.

Asociaciones genotípicas y haplotípicas

Para determinar el riesgo a enfermar de tuberculosis de cada genotipo, se calculó la razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95%, mediante el cálculo de χ^2 (chi cuadrada), los cálculos se realizaron con el programa STATA SE 9.2 (cálculos detallados, ver Anexo II).

Para determinar el riesgo a enfermar de tuberculosis para cada haplotipo, se ordenaron los polimorfismos de acuerdo al cromosoma en que se encuentran. En el cromosoma 1 los polimorfismos en *FCGR2A* H131R (A/G) y *FCGR3A* V158F (C/A), para el cromosoma 4 los polimorfismos en *TLR1* S248N (C/T), *TLR6* S249P (A/G), *TLR10* A163S (C/A) y *TLR10* I298V (T/C) y finalmente en el cromosoma 9 los polimorfismos en *TLR4* D299G (A/G) y *TLR4* T399I (C/T). El análisis se llevó a cabo con el programa HaploView 4.2.

Desequilibrio de Ligamiento (LD)

El desequilibrio de ligamiento se calculó haciendo uso del programa HaploView 4.2, en donde con los datos obtenidos de la base de datos de NCBI para cada polimorfismo, aparte de agrupar a los polimorfismos de acuerdo al cromosoma en el que se encuentran también se utilizó la posición en donde se localizan dentro del cromosoma.

Resultados:

Estudio de casos y controles

Se realizó un estudio de casos y controles para determinar si polimorfismos presentes en receptores tipo Toll (TLRs) y receptores para la porción Fc de IgGs (FcγRs) tienen alguna asociación con la susceptibilidad a padecer tuberculosis. La región de estudio se seleccionó debido a la alta incidencia de la enfermedad en el estado de Veracruz.

Para el estudio se reunieron un total de 853 muestras sanguíneas provenientes de 281 casos y 572 controles, de cada una de las cuales se extrajo el ADN y se llevó a cabo la discriminación alélica por PCR en tiempo real de los polimorfismos en *TLR1* S248N (C/T), *TLR2* R753Q (G/A), *TLR4* T399I (C/T), *TLR4* D299G (A/G), *TLR6* S249P (A/G), *TLR10* A163S (C/A), *TLR10* I298V (T/C), *FCGR2A* H131R (A/G) y *FCGR3A* V158F (C/A).

En la figura 5 se muestra una gráfica representativa de los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, en donde la distinta fluorescencia (VIC o FAM) representa a los dos distintos alelos que se estén analizando.

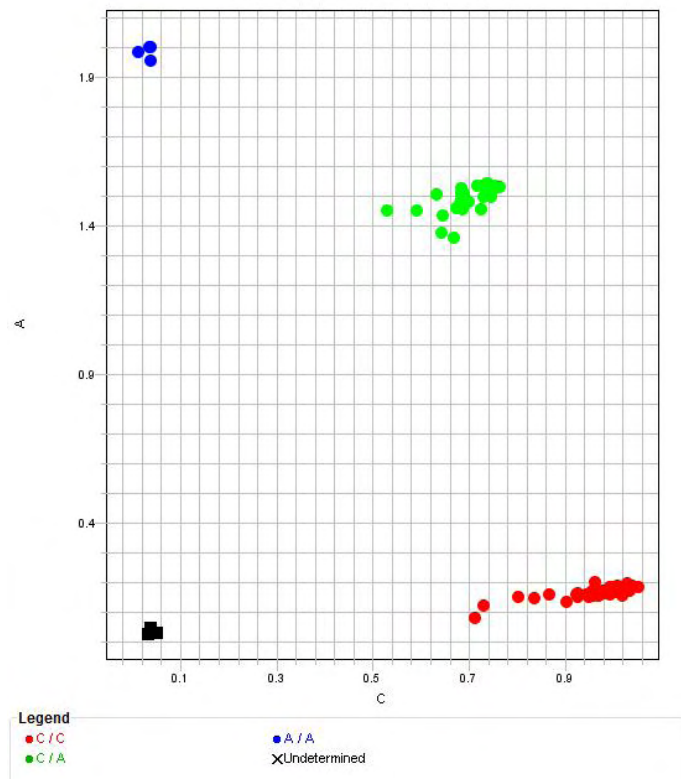


Figura #5. Discriminación alélica por PCR en tiempo real. Ejemplo representativo de los resultados obtenidos durante la genotipificación por PCR en tiempo real del SNP en *TLR10* A163S. Cada punto representa a un individuo, el color rojo (VIC) indica a los homocigotos para el alelo ancestral, el color azul (FAM) a los homocigotos para el cambio y en color verde (VIC/FAM) a los heterocigotos.

Si solo hay detección de un solo fluoróforo (amplificación de un alelo), se trata de un individuo homocigoto, si se detectan ambos fluoróforos (amplificación de ambos alelos) se trata de un individuo heterocigoto.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

Con los datos obtenidos del equipo de PCR en tiempo real, se genotipificaron individualmente cada uno de los participantes (casos y controles) y se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas de cada polimorfismo.

En la tabla 3 se muestra que para todos los polimorfismos la prueba de χ^2 indica que la población sigue el equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 > 3.84$, $p < 0.05$), es decir que no hay una diferencia entre la población observada o recolectada y la población esperada o calculada. Por lo tanto la población control (no enferma de tuberculosis) no está sesgada por algún tipo de factor y fue seleccionada al azar.

Tabla 3. Equilibrio de Hardy-Weinberg

TLR1 S248N (C→T)	FG	FA	OBS	ESP
CC	0.3077	0.55	176	174.57
CT	0.4895		280	282.85
TT	0.2028	0.45	116	114.57
Total	1	1	572	572
$\chi^2 = 0.058$				
TLR2 R753Q (G→A)	FG	FA	OBS	ESP
AA	0.0000	0.00	0	0.00
AG	0.0018		1	1.00
GG	0.9982	1.00	568	568.00
Total	1	1	569	569
$\chi^2 = 0.00044$				

TLR4 D299G (A→G)	FG	FA	OBS	ESP
AA	0.9441	0.97	540	540.45
AG	0.0559		32	31.10
GG	0.0000	0.03	0	0.45
Total	1	1	572	572
$\chi^2 = 0.473$				

TLR4 T399I (C→T)	FG	FA	OBS	ESP
CC	0.9545	0.98	545	545.30
CT	0.0455		26	25.41
TT	0.0000	0.02	0	0.30
Total	1	1	571	571
$\chi^2 = 0.310$				

TLR6 S249P (A→G)	FG	FA	OBS	ESP
AA	0.0053	0.07	3	3.09
AG	0.1368		78	77.81
GG	0.8579	0.93	489	489.09
Total	1	1	570	570
$\chi^2 = 0.0034$				

TLR10 A163S (C→A)	FG	FA	OBS	ESP
CC	0.6573	0.81	376	378.83
CA	0.3129		179	173.34
AA	0.0297	0.19	17	19.83
Total	1	1	572	572
$\chi^2 = 0.609$				

TLR10 I298V (T→C)	FG	FA	OBS	ESP
TT	0.0297	0.19	17	19.83
TC	0.3129		179	173.34
CC	0.6573	0.81	376	378.83
Total	1	1	572	572
$\chi^2 = 0.609$				
FCGR2A H131R (A → G)	FG	FA	OBS	ESP
AA	0.2250	0.47	128	126.23
AG	0.4921		280	283.54
GG	0.2830	0.53	161	159.23
Total	1	1	569	569
$\chi^2 = 0.089$				
FCGR3A V158F (C→A)	FG	FA	OBS	ESP
AA	0.0411	0.19	23	19.72
AC	0.2934		164	170.55
CC	0.6655	0.81	372	368.72
Total	1	1	559	559
$\chi^2 = 0.826$				

FG (frecuencia genotípica), FA (frecuencia alélica), OBS (observado), ESP (esperado).

Una vez que se comprobó que la muestra de la población cumple con el Equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los polimorfismos y que nuestra toma de muestra es correcta y no se encuentra sesgada por algún factor, se puede proceder a realizar el análisis de casos y controles respecto a padecer tuberculosis de los polimorfismos genotipificados.

Influencia de los polimorfismos en la susceptibilidad a padecer tuberculosis

Para determinar si cada uno de los polimorfismos, puede constituir un factor protector o de riesgo para enfermar de tuberculosis en la población estudiada, se calcularon las Razones de Momios (OR). El análisis se realizó por genotipos, por lo que el genotipo homocigoto para el alelo ancestral es contra el que se realizaron las comparaciones de los genotipos restantes.

Cuando el valor de la razón de momios es menor a uno ($OR < 1$) se trata de un factor protector, cuando el valor es mayor a uno ($OR > 1$) se trata de un factor de riesgo. Para que este valor tenga validez debe ser estadísticamente significativo, lo que representaría una P (χ^2) menor o igual a 0.05.

Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 4, en donde se observa que de los 7 polimorfismos que se analizaron para los receptores tipo Toll (TLRs), solo dos muestran tener una asociación a padecer tuberculosis con significancia estadística ($p < 0.05$). De los dos polimorfismos analizados en genes de receptores para IgG (*FCGR2A* y *FCGR3A*), ninguno mostró tener asociación con riesgo o protección a padecer tuberculosis.

Tabla 4. Asociaciones genotípicas (OR) entre casos y controles

TLR1 S248N (C→T)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	p (χ^2)
CC	85 (30.2)	176 (30.8)	1	
CT	136 (48.4)	280 (48.9)	1.006	0.97
TT	60 (21.4)	116 (20.3)	1.071	0.74
Total	281 (100)	572 (100)		

TLR2 R753Q (G→A)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	p (χ^2)
AA	0 (0)	0 (0)	---	
AG	0 (0)	1 (0.2)	---	
GG	281 (100)	568 (99.8)	1	
Total	281 (100)	569 (100)		

TLR4 T399I (C→T)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	<i>p</i> (χ^2)
CC	276 (98.6)	545 (95.4)	1	
CT	4 (1.4)	26 (4.6)	0.304	0.02
TT	0 (0)	0 (0)	---	
Total	280 (100)	571 (100)		

TLR4 D299G (A→G)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	<i>p</i> (χ^2)
AA	276 (98.6)	540 (94.4)	1	
AG	3 (1.1)	32 (5.6)	0.183	0.0018
GG	1 (0.3)	0	---	
Total	280 (100)	572 (100)		

TLR6 S249P (A→G)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	<i>p</i> (χ^2)
AA	1 (0.4)	3 (0.5)	0.69	0.74
AG	42 (14.9)	78 (13.7)	1.106	0.63
GG	238 (84.7)	489 (85.8)	1	
Total	281 (100)	570 (100)		

TLR10 A163S (C→A)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	<i>p</i> (χ^2)
CC	193 (68.7)	376 (65.7)	1	
CA	78 (27.8)	179 (31.3)	0.849	0.31
AA	10 (3.5)	17 (3)	1.146	0.74
Total	281 (100)	572 (100)		

TLR10 I298V (T←C)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	<i>p</i> (χ^2)
TT	10 (3.5)	17 (3)	1.146	0.74
TC	78 (27.8)	179 (31.3)	0.849	0.31
CC	193 (68.7)	376 (65.7)	1	
Total	281 (100)	572 (100)		

FCGR2A H131R (A → G)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	<i>p</i> (χ^2)
AA	69 (24.6)	128 (22.5)	1.08	0.69
AG	131 (46.8)	280 (49.2)	0.942	0.73
GG	80 (28.6)	161 (28.3)	1	
Total	280 (100)	569 (100)		

FCGR3A V158F (C → A)	Casos n (%)	Controles n (%)	OR	<i>p</i> (χ^2)
CC	13 (4.6)	23 (4.1)	1.07	0.83
CA	72 (25.7)	164 (29.3)	0.838	0.28
AA	195 (69.7)	372 (66.6)	1	
Total	280 (100)	559 (100)		

Los dos polimorfismos analizados para el gen de *TLR4* (T399I y D299G), muestran que el tener la variante alélica de manera heterocigótica es un factor protector ($OR < 1$) con $OR=0.304$ y $OR=0.183$ respectivamente, estas asociaciones son estadísticamente significativas para ambos polimorfismos ($p < 0.05$). La frecuencia de estos polimorfismos es muy baja en la población de estudio, pues las frecuencias alélicas en la población sana son solo del 3% (D299G) y del 2% (T399I). En el análisis por genotipos, el porcentaje de individuos heterocigotos es significativamente mayor en la población sana, siendo las frecuencias aproximadamente 3.3 veces mayor en la población sana para el polimorfismo en T399I y hasta 5 veces mayor para el polimorfismo en D299G (Tabla 4). Al analizar las frecuencias genotípicas es interesante que no se encontraran individuos homocigotos para estos polimorfismos del *TLR4* (299GG y 399II) en la población control, mientras que en la población enferma no se encontró el genotipo 399II y únicamente se encontró un individuo con el genotipo 299GG.

Nuestros resultados muestran que en la población del Estado de Veracruz, los polimorfismos T399I y D299G del *TLR4* en forma heterocigota, están asociados a un menor riesgo de enfermar de tuberculosis. Estos polimorfismos en *TLR4* se han encontrado asociados con una mayor

susceptibilidad a diversas enfermedades como cáncer gástrico, colitis ulcerativa e infección por malaria [60]. Sin embargo, un estudio realizado en población colombiana no encontró ninguna asociación con tuberculosis, así como tampoco se encontró asociación entre estos polimorfismos y tuberculosis en estudios realizados en una población hindú y en Gambia [50], [52], [61]. Por otra parte, un estudio en población holandesa, mostró una asociación protectora de estos polimorfismos para la enfermedad del legionario (*Legionella pneumophila*) [62], que es producida por una bacteria intracelular como lo es *Mycobacterium tuberculosis*, por lo tanto estos polimorfismos podrían conferir una protección a este tipo de infecciones bacterianas.

Entre los genes que se analizaron, se incluyeron polimorfismos en receptores para la porción Fc de Inmunoglobulinas G (*FCGR2A* H131R y *FCGR3A* V158F), en estos casos no se encontró ninguna asociación o tendencia a representar un factor de protección o de riesgo (OR \approx 1).

Debido a que varios polimorfismos se encuentran dentro de un mismo cromosoma, se agruparon para llevar a cabo el análisis de una posible asociación con tuberculosis de los haplotipos presentes en la población.

Los polimorfismos en *FCGR2A* H131R (A/G) y *FCGR3A* V158F (C/A) se encuentran en el cromosoma 1 por lo que se realizó el análisis de estos dos polimorfismos (Tabla 5). Hay varios haplotipos presentes en la población, sin embargo ninguno tiene alguna asociación o tendencia a ser un factor de riesgo o protector (OR \approx 1).

Tabla 5. Asociaciones haplotípicas en el cromosoma 1.

Haplotipo	# Controles (h:oh), Casos (h:oh)	OR	$p(x^2)$
GC	533 : 569, 266 : 288	0.99	0.885
AC	364 : 738, 191 : 363	1.07	0.549
AA	152 : 950, 77 : 477	1	0.965
GA	53 : 1049, 20 : 534	0.74	0.272

h, haplotipo; oh, otros haplotipos

En el cromosoma 4 se encuentran varios polimorfismos, *TLR1* S248N (C/T), *TLR2* R753Q (G/A), *TLR6* S249P (A/G), *TLR10* A163S (C/A), *TLR10* I298V (T/C). El polimorfismo en *TLR2* R753Q (G/A) no se incluyó en el análisis de haplotipos por su muy baja o casi nula frecuencia.

En la Tabla 6, el haplotipo de menor frecuencia (GTAC) tiene una tendencia a ser un factor protector (OR = 0.4), y esta influencia es estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). Las variantes que se representan en este haplotipo son *TLR6* 249P (G), *TLR10* 163S (T), *TLR10* 298I (A) y *TLR1* 248S (C), de estas las variantes en *TLR6* y *TLR1* corresponden al alelo ancestral, mientras que para las variantes en *TLR10* se trata de la variante con una frecuencia menor. Los demás haplotipos presentes en la población de estudio de los polimorfismos analizados dentro del cromosoma 4 no tienen influencia sobre la susceptibilidad a adquirir tuberculosis (Tabla 6).

Tabla 6. Asociaciones haplotípicas en el cromosoma 4.

Haplotipo	# Controles (h:oh), Casos (h:oh)	OR	p (χ^2)
GCCC	560 : 574, 295 : 263	1.14	0.178
GCCT	279 : 855, 123 : 436	0.86	0.233
GTAT	173 : 961, 90 : 468	1.07	0.637
ACCT	68 : 1066, 40 : 518	1.21	0.368
GTAC	30 : 1103, 6 : 551	0.40	0.036

h, haplotipo; oh, otros haplotipos

Por último en la Tabla 7, se observan los haplotipos de los polimorfismos en *TLR4* D299G (A/G) y *TLR4* T399I (C/T) que se encuentran en el cromosoma 9. De los cuatro haplotipos posibles, solo hay dos presentes en la población de análisis, el de mayor frecuencia es el haplotipo AC (299D/399T) que se encuentra asociado a ser un factor de riesgo (OR=3.05, $p=0.0165$) y el de menor frecuencia GT (299G/399I) que se encuentra asociado a ser un factor protector (OR=0.35, $p=0.0466$). Ambas asociaciones son estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabla 7. Asociaciones haplotípicas en el cromosoma 9.

Haplotipo	# Controles (h:oh), Casos (h:oh)	OR	p (x ²)
AC	1108 : 32, 553 : 5	3.19	0.011
GT	25 : 1115, 4 : 554	0.322	0.027

h, haplotipo; oh, otros haplotipos

Desequilibrio de ligamiento (LD)

El desequilibrio de ligamiento (LD) identifica combinaciones de alelos o marcadores genéticos que se encuentran en una población con una mayor o menor frecuencia de lo que se esperaría de una combinación al azar de los alelos con base a sus frecuencias.

Para este tipo de análisis se agruparon los polimorfismos de acuerdo al cromosoma en donde se encuentren y su posición dentro del cromosoma. En la Figura 5 se encuentran los gráficos para cada cromosoma, los valores de LD que se muestran (D') cuanto más cercanos sean a 100 son indicativos de un alto desequilibrio de ligamiento.

Los polimorfismos en *FCGR2A* H131R (A/G) y *FCGR3A* V158F (C/A) se encuentran en el cromosoma 1 y tienen un valor de $D'=54$, lo cual indica un bajo ligamiento entre estos polimorfismos (Figura 5A).

En la Figura 5B se muestran los polimorfismos localizados en el cromosoma 4, *TLR1* S248N (C/T), *TLR6* S249P (A/G), *TLR10* A163S (C/A), *TLR10* I298V (T/C), excepto el polimorfismo en *TLR2* R753Q (G/A), el cual se excluyó de este análisis por tener una frecuencia casi nula. De acuerdo a los valores de D' obtenidos, se observa que los dos polimorfismos en *TLR10* tienen un alto desequilibrio de ligamiento ($D'=97$), lo que indica que hay una alta probabilidad de que si una persona tiene el polimorfismo en *TLR10* 163S se encuentre también el polimorfismo en *TLR10* 298V. Para el resto de los polimorfismos, el desequilibrio de ligamiento es menor ($83 > D' > 73$).

Por último, en la Figura 5C se observan los polimorfismos en *TLR4* T399I (C/T) y *TLR4* D299G (A/G) que se localizan en el cromosoma 9, los cuales se encuentran con un alto desequilibrio de ligamiento ($D'=96$). De igual manera que para los polimorfismos en *TLR10*, un valor alto de LD indica que cuando se encuentre el polimorfismo en *TLR4* 299G hay una alta probabilidad de tener el polimorfismo en *TLR4* 399I.

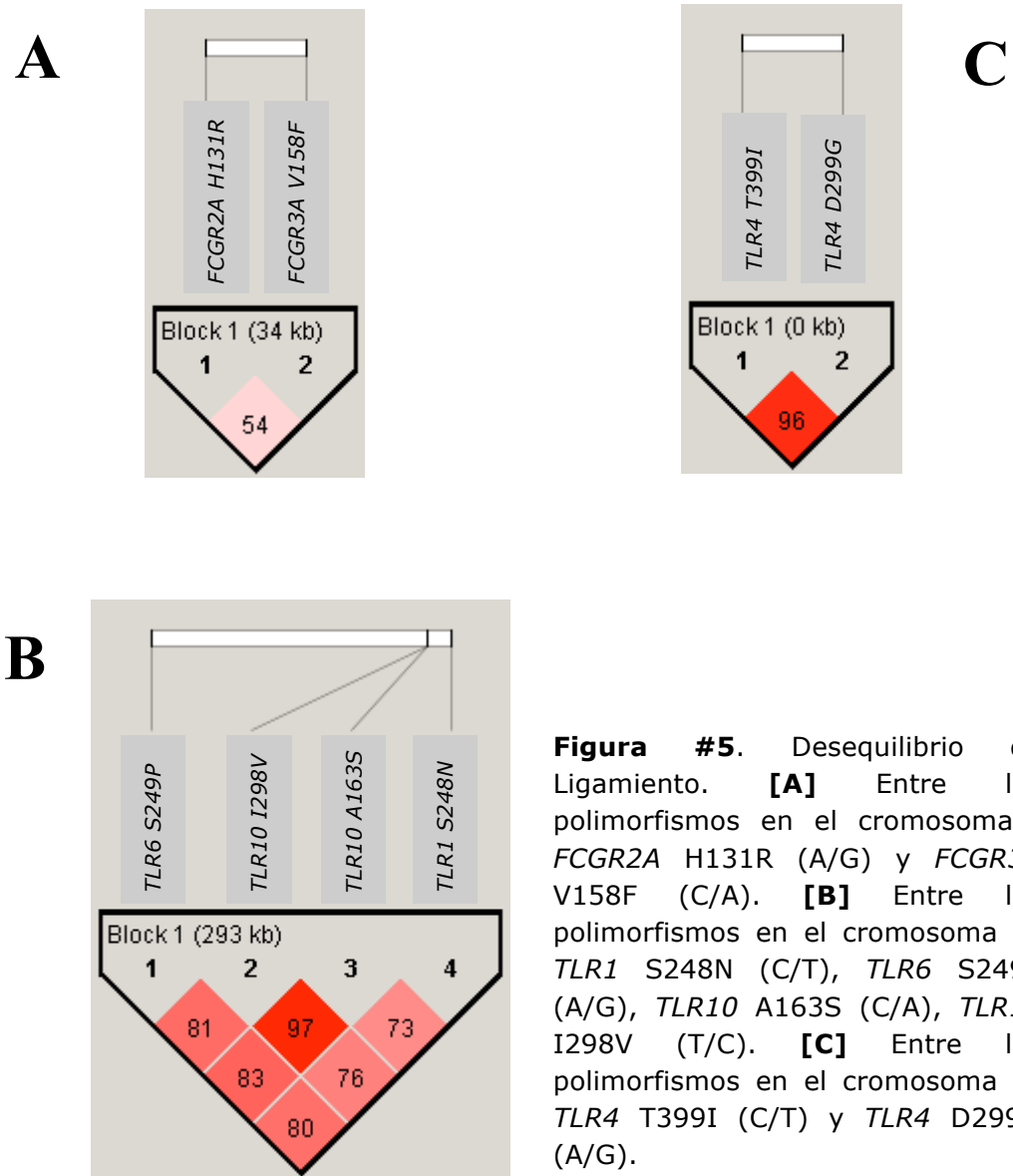


Figura #5. Desequilibrio de Ligamiento. **[A]** Entre los polimorfismos en el cromosoma 1: *FCGR2A* H131R (A/G) y *FCGR3A* V158F (C/A). **[B]** Entre los polimorfismos en el cromosoma 4: *TLR1* S248N (C/T), *TLR6* S249P (A/G), *TLR10* A163S (C/A), *TLR10* I298V (T/C). **[C]** Entre los polimorfismos en el cromosoma 9: *TLR4* T399I (C/T) y *TLR4* D299G (A/G).

Discusión

A nivel mundial, la tuberculosis es una enfermedad de gran importancia debido al elevado número de casos que se presentan cada año, es por esto que es de suma importancia el estudio de los distintos factores que puedan influir en la resistencia o susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. Para el desarrollo de la tuberculosis se ven involucrados factores ambientales (condiciones de vivienda, clima, nivel socio-económico, estado nutricional, convivir con individuos enfermos o tener contacto directo con ellos) o factores genéticos, como polimorfismos que afecten la funcionalidad de las proteínas involucradas en la defensa del organismo en el transcurso de la infección [8], [63]. Dentro de los factores genéticos, se han realizado varios estudios acerca de la posible influencia de polimorfismos en distintos genes, como los genes que codifican para los receptores tipo Toll (TLRs), genes de citocinas (IFN γ , interleucinas, TNF α) y de sus receptores, moléculas de señalización como MyD88, factores de transcripción (IRFs), NRAMP1, entre otros genes involucrados en la respuesta inmune contra micobacterias [3], [47], [64].

En el Estado de Veracruz la tuberculosis tiene una prevalencia relativamente alta, siendo el 9° lugar en México con mayor número de casos en 2012, es por ello que se realizó el estudio de algunos polimorfismos en TLRs y Fc γ Rs para analizar su posible influencia en el riesgo a desarrollar la enfermedad en esta población, comparando la frecuencia con que se presentan estos polimorfismos en personas sanas con sus frecuencias en personas que presentan tuberculosis, en un estudio de casos y controles.

Al analizar las muestras de 281 personas enfermas y 572 personas sanas, se encontró que dos polimorfismos en el gen de *TLR4* son un factor protector (OR < 1) contra la enfermedad (Tabla 4), ya que la frecuencia con que se encontraron las variantes 299G y 399I de manera heterocigota en la población sana, es significativamente mayor a la frecuencia de estas variantes en la población enferma. De igual manera, al realizar el análisis por haplotipos (Tabla 7), se encontró que aquellos individuos que presentan las variantes 299G y 399I se encontraban en mayor proporción en la población sana, por lo

que este haplotipo representa un factor protector. Por el contrario, el haplotipo con las variantes 299D y 399T resultó ser un factor de riesgo para padecer tuberculosis. Estos polimorfismos se encuentran en un alto desequilibrio de ligamiento ($D' = 96$, Figura 5), lo cual ya había sido observado en estudios previos [65]–[67].

Estos dos polimorfismos (*TLR4* D299G y T399I) se han analizado en distintas poblaciones humanas en relación a otros padecimientos como cáncer gástrico, colitis ulcerativa e infección por malaria, entre otras, asociándoseles con una mayor susceptibilidad a padecer dichas enfermedades [60]. Respecto a tuberculosis, un estudio realizado en población colombiana no arrojó algún tipo de asociación, ni tampoco encontraron asociación entre TB y la frecuencia de estos polimorfismos en poblaciones hindú, iraní y de Gambia [50], [52], [61], [68].

En México, en dos estudios similares para evaluar la influencia de estos polimorfismos en la susceptibilidad a tuberculosis en una población indígena del estado de Oaxaca y otro en población mestiza del estado de Nuevo León [69], [70], no se encontró ningún tipo de influencia en ninguno de los dos estudios. En ambos casos las frecuencias encontradas son muy bajas para el polimorfismo ($\sim 3\%$ de manera heterocigota en la población sana), y el tamaño de muestra es menor (aproximadamente 90 a 104 enfermos con tuberculosis) al que se analizó en este trabajo (281 pacientes), aunque también debe tomarse en cuenta que en uno de estos se analizó a una población indígena y no mestiza como en el presente trabajo.

En un estudio en población holandesa, se encontró una asociación de estos polimorfismos de *TLR4* como un factor de protección para la enfermedad del legionario (ocasionada por la bacteria *Legionella pneumophila*) [62], la cual es una bacteria intracelular como *Mycobacterium tuberculosis* [8], [71]. Por lo tanto, estos polimorfismos podrían conferir una protección a este tipo de infecciones bacterianas.

Respecto al posible efecto de estos polimorfismos en *TLR4* (D299G y T399I) sobre la funcionalidad del receptor, en ensayos *in vitro* se ha observado que cuando estos polimorfismos se encuentran presentes hay una dimerización

del receptor disminuida al estimular con LPS o con monofosforil lípido A (MPL) [43], lo cual puede afectar en la activación de la vía de señalización del receptor. En otro estudio *in vitro* en células HEK-293 transfectadas con el receptor nativo o con el polimorfismo en D299G, se observó que hay una menor fosforilación de p38 y TANK, así como una menor activación de NF- κ B e IRF3 y una menor interacción de MyD88 y TRIF al co-inmunoprecipitar con TLR4, cuando se tiene el polimorfismo (299G). En este mismo estudio no se encontraron los mismos cambios para el polimorfismo T399I, aunque también se observa una tendencia a disminuir la activación de NF- κ B sin ser estadísticamente significativa [72].

Por otra parte, en ensayos *in vitro* en células de la línea THP-1 (línea celular monocítica) diferenciada a macrófagos, en macrófagos derivados de monocitos y en macrófagos alveolares humanos, se observó que el inhibir la activación del factor transcripcional NF- κ B, ya sea con un inhibidor sintético o un adenovirus que interrumpe la vía de señalización para la activación del factor transcripcional, resultaba en un menor número de bacterias intracelulares vivas y un aumento en la apoptosis y autofagia al infectar las células con *Mycobacterium tuberculosis* [74].

Considerando todos estos datos, se puede adelantar una hipótesis para explicar el mecanismo por el cual los polimorfismos analizados en *TLR4* pueden ser factores protectores para desarrollar tuberculosis, si estos polimorfismos resultan en una menor activación de las vías de señalización de TLR4 que llevan a la activación de NF- κ B, y que esto repercuta en una mejor capacidad para destruir la micobacteria.

El resto de los polimorfismos analizados en distintos *TLRs*, no mostraron ejercer ningún tipo de influencia respecto a padecer tuberculosis en la población analizada. De estos, cabe mencionar que la frecuencia en la población encontrada del polimorfismo en *TLR2* R753Q, es extremadamente baja o prácticamente nula, para este polimorfismo ya se han llevado a cabo análisis en otras poblaciones como en Turquía, en donde se encontró como un factor de riesgo para tuberculosis [45]. También se ha visto que este polimorfismo afecta la señalización pues el cambio se encuentra dentro del

dominio TIR, además de que la dimerización del TLR2 polimórfico con TLR6, se ve reducida [75]. En el estudio recientemente realizado en una población oaxaqueña, de manera similar a lo encontrado por nosotros, la frecuencia de este polimorfismo es nula en los 90 casos y 90 controles que genotipificaron [70], por lo que se podría deducir que en la población mexicana este polimorfismo se encuentra prácticamente ausente.

En el estudio por haplotipos, para los polimorfismos en genes presentes en el cromosoma 4, el haplotipo GTAC se encontró como un factor protector (OR = 0.4) con significancia estadística ($p \leq 0.05$). Las variantes que conforman este haplotipo son en *TLR6* 249P (G), *TLR10* 163S (T), *TLR10* 298I (A) y *TLR1* 248S (C), de estas las dos variantes en *TLR10* corresponden a la mutación y para las variantes en TLR6 y TLR1 se trata del alelo ancestral. El polimorfismo en *TLR6* tiene una frecuencia muy baja (7% de forma alélica), los polimorfismos en *TLR10* tienen una frecuencia del 19% de forma alélica y la variante *TLR1* 248S tiene una frecuencia alta ya que se trata del alelo ancestral (55% de forma alélica) pero no hay una diferencia muy alta en la frecuencia respecto al polimorfismo.

En este estudio, en la población de Veracruz, no se encontró ningún tipo de asociación por genotipos a las distintas variantes que conforman el haplotipo protector. En un estudio *in vitro* utilizando sangre completa, se incubó con lipopéptidos o lisados de micobacterias se obtuvo una menor secreción de IL-6 en individuos homocigotos para la variante en *TLR6* 249S [76]. Respecto a los polimorfismos en *TLR10* en un estudio realizado en población hispana se encontró que las variantes 163S y 298A son un factor de riesgo (OR=2.31 y 2.07 respectivamente y $p < 0.05$), de igual manera en el mismo estudio la variante en TLR6 249S se encontró un OR=1.64 ($p < 0.05$) [47].

Durante el transcurso y la resolución de la infección por tuberculosis, los receptores para la fracción constante de anticuerpos no son considerados trascendentales por tratarse de una bacteria intracelular, sin embargo en estudios realizados con ratones, se observa una mayor sobrevivencia cuando hay anticuerpos de la clase IgG contra la micobacteria [41]. En estudios con

otras bacterias intracelulares como *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium bovis*, se ha observado que la señalización por receptores Fc ayuda a dirigir a el fagosoma conteniendo a la bacteria, a fusionarse con lisosomas [40].

En el presente estudio se incluyeron dos polimorfismos en receptores para la fracción constante de anticuerpos IgG, *FCGR2A* H131R y *FCGR3A* V158F. Estos polimorfismos se han involucrado en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y púrpura trombocitopénica [59], y se sabe que estos polimorfismos afectan la afinidad de los receptores por las distintas subclases de IgG [77]. En un análisis realizado en una población marroquí, no se encontró ninguna asociación entre la presencia de estos polimorfismos y tuberculosis [78]. De igual manera, en la población de Veracruz no se encontró ninguna asociación o tendencia a que los polimorfismos tengan alguna influencia sobre el riesgo de adquirir tuberculosis (OR \approx 1), por lo que sería interesante analizar otros polimorfismos en receptores para la porción Fc de inmunoglobulinas G, ya que los polimorfismos que se analizaron no tienen relación alguna con el riesgo de padecer tuberculosis.

Finalmente, las frecuencias obtenidas en la muestra de la población sana en el Estado de Veracruz al compararlas con frecuencias obtenidas en otras poblaciones según la base de datos de NCBI (tabla 8), se encontraron resultados similares a las realizadas en estudios en EUA (Los Angeles, California) en individuos con ancestría mexicana para casi todos los polimorfismos. Al comparar con otro tipo de población (asiática, europea o hispánica) se notan diferencias como en el polimorfismo para *TLR2* R753Q en donde en población caucásica e hispana es mayor la frecuencia que la encontrada en Veracruz. Otros polimorfismos (*FCGR3A* V158F, *TLR10* A163S; V298I) las frecuencias son muy distintas respecto a poblaciones asiática y europea. Por lo que los datos obtenidos de Veracruz son una fuente importante para conocer el fondo genético en cuanto a los polimorfismos analizados para la población mexicana mestiza.

Tabla 8. Frecuencias de los polimorfismos en el estado de Veracruz respecto a otras poblaciones

SNP	Alelo	Genotipo	HISP	MEX	EUR	JPT	VRZ
TLR1 248 S/N	C/T	CC		0.2			0.31
		CT		0.5			0.49
		TT		0.3			0.20
TLR2 753 R/Q	A/G	AA	0		0		0
		AG	0.087		0.103		0.002
		GG	0.913		0.897		0.998
TLR4 299 D/G	A/G	AA	0.913	0.939	0.933		0.94
		AG	0.087	0.061	0.067		0.06
		GG	0	0	0		0
TLR4 399 T/I	C/T	CC	0.913	0.878	0.92		0.95
		CT	0.043	0.122	0.071		0.05
		TT	0.044	0	0.009		0
TLR6 249 S/P	A/G	AA		0.04	0.183		0.005
		AG		0.3	0.45		0.137
		GG		0.66	0.367		0.858
TLR10 163 A/S	C/A	CC			0.95	0.727	0.66
		CA			0.05	0.227	0.31
		AA			0.0	0.045	0.03
TLR10 298 V/I	C/T	CC		0.583	0.92	0.738	0.66
		CT		0.417	0.08	0.238	0.31
		TT		0	0	0.024	0.03
FCGR2A 131 R/H	C/T	AA	0.304	0.4			0.225
		AG	0.478	0.34			0.492
		GG	0.218	0.26			0.283
FCGR3A 158 V/F	G/T	CC				0.591	0.666
		AC				0.386	0.293
		AA				0.023	0.041

MEX- 100 individuos con ascendencia mexicana de Los Angeles

HISP- 23 individuos que se denominan como hispanos

EUR- 90 individuos de Utah, con ascendencia europea

JPT- 100 individuos de Tokio, Japón

*Fuente: National Center for Biotechnology Information

Conclusiones

- ✓ Las variantes en TLR4 (G299 e I399) son un factor de protección de manera heterocigota a adquirir tuberculosis con un OR = 0.183 y OR = 0.304 respectivamente ($p < 0.05$ en ambos casos).
- ✓ En el análisis por haplotipos, cuando se tienen las variantes TLR4 299G/399I se tiene una influencia protectora (OR = 0.3, $p < 0.05$) y otro haplotipo con influencia protectora es el conformado por TLR6 249S, TLR10 163A, TLR10 298V y TLR1 248N (OR = 0.4, $p < 0.05$).
- ✓ Los polimorfismos con un alto desequilibrio de ligamiento son entre TLR10 A163S y TLR10 I298V (97%), al igual que entre los polimorfismos en TLR4 T399I y TLR4 D299G (96%).
- ✓ Para los polimorfismos y haplotipos restantes no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con el riesgo a padecer tuberculosis.
- ✓ Las variantes TLR4 299G y 399I se han asociado a una menor activación de NF- κ B, lo cual pudiera favorecer la eliminación de la micobacteria ya que en ensayos *in-vitro* la inhibición de NF- κ B resulta en un aumento en la apoptosis y autofagia en macrófagos alveolares y en macrófagos derivados de monocitos, mecanismos que se sabe favorecen la muerte de *Mycobacterium tuberculosis* dentro del macrófago infectado.

Perspectivas

- Comparar la activación de NF- κ B a través de extractos de micobacterias en células HEK-293 transfectadas con las distintas variantes en TLR4 (D299G; T399I).
- Implementar un ensayo *in vitro* en macrófagos (en donadores humanos o ratones TLR4^{-/-}) para comprobar la influencia de los polimorfismos en TLR4 y analizar la diferencia en expresión de citocinas, tipo de activación de los macrófagos, fagocitosis y sobrevivencia de la micobacteria.
- En la muestra de la población veracruzana tomada, analizar polimorfismos en genes que codifiquen para citocinas como IL-10, IFN- γ , TNF- α , entre otras y otros tipos de receptores como el receptor de manosa o NRAMP1, los cuales participan en la respuesta a tuberculosis.

Anexo I

Equilibrio de Hardy-Weinberg

La ley de Hardy-Weinberg constituye el principio básico de la genética poblacional, la cual indica que los distintos genotipos se distribuyan de acuerdo a las frecuencias alélicas en una población.

Si ambos alelos se distribuyen de manera aleatoria, la distribución de los genotipos homocigotos y heterocigoto deberá cumplir con la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

En esta ecuación p y q representan a cada uno de los alelos presentes en el polimorfismo. Con estas frecuencias se realiza el cálculo del valor esperado para cada genotipo, tomando en cuenta el número total de valores, de igual manera que en el siguiente ejemplo:

Genotipo	Observado	Esperado
MM	392	$p^2 \times 1419 = 399$
MN	707	$2pq \times 1419 = 707$
NN	320	$q^2 \times 1419 = 313$
Total	1419	1410

Después de calcular los valores esperados, se hace una prueba estadística de chi cuadrada (χ^2):

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(\text{Observado} - \text{Esperado})^2}{\text{Esperado}} \right]$$

Si la distribución se encuentra en equilibrio, el valor de χ^2 debe ser menor a 3.84, lo que indicaría una $p < 0.05$.

Anexo II

Razón de Momios (OR)

Para obtener las medidas de asociación o el efecto que cuantifican la presencia y la magnitud de la asociación entre un factor de interés y un evento se utiliza la razón de momios (odds ratio, OR), este parámetro señala la probabilidad de que una persona enferma (caso) haya estado expuesta al factor de estudio (el polimorfismo), con respecto a la probabilidad de que una persona sana (control) lo haya estado y con base en ello su interpretación es en términos de las veces más o menos de riesgo que tiene una persona de enfermar cuando estuvo expuesta al factor de interés (cuando tiene la variante alélica), en comparación con aquellos sujetos no expuestos (que no la tienen).

Si se toma en cuenta una tabla:

	Casos	Controles	Total
Expuestos	a	b	a+b=ni
No expuestos	c	d	c+d=no
Total	a+c=mi	b+d=mo	n

El cálculo de la razón de momios (OR) queda dado por la siguiente fórmula:

$$RM(OR) = \frac{a * d}{b * c}$$

Cuando de la razón de momios se obtiene una cifra mayor de uno, esto indica que el factor en estudio (la variante alelica) se está comportando como un factor de riesgo, en cambio cuando el resultado es menor a la unidad, se traduce en que el factor de estudio se comporta como un factor protector. También puede darse la situación de que el resultado sea igual a uno, en cuyo caso la interpretación será que no existe asociación entre el factor de interés y la enfermedad o evento resultado.

La aplicación de una prueba de hipótesis en cuyo caso la prueba X_{MH} de Mantel y Haenszel suele ser la más utilizada cuando se trata de una tabla de dos por dos.

$$X_{mh} = \frac{(a * d) - (b * c)}{\sqrt{\frac{mi*mo*ni*no}{n-1}}}$$

Un valor de OR estadísticamente significativo sería cuando el valor de X_{MH} sea mayor a 3.84, lo que indicaría una $p < 0.05$ [79], [80].

✓ Cloroformo-alcohol isoamílico (49:1)

Cloroformo 19.6mL

Alcohol isoamílico 400 μ L

*De ser necesario una mayor volumen de la solución, se escalaron los volúmenes cuantas veces fuera necesario.

✓ Etanol 70%

Etanol absoluto (MERCK) 14mL

Agua inyectable 6mL

*De ser necesario una mayor volumen de la solución, se escalaron los volúmenes cuantas veces fuera necesario.

Referencias:

- [1] S. Ahmad, "Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection.," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2011, p. 814943, Jan. 2011.
- [2] G. Delogu, M. Sali, and G. Fadda, "The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection.," *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 5, no. 1, p. e2013070, Jan. 2013.
- [3] J. Kleinnijenhuis, M. Oosting, L. a B. Joosten, M. G. Netea, and R. Van Crevel, "Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2011, p. 12 pages, Jan. 2011.
- [4] WHO, "GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT," 2012.
- [5] I. M. Orme and F. Collins, "Tuberculosis: Immunity," *Encycl. Life Sci.*, pp. 1-7, 2007.
- [6] D. J. Hackam, O. D. Rotstein, W. Zhang, S. Gruenheid, P. Gros, and S. Grinstein, "Host Resistance to Intracellular Infection : Mutation of Natural Resistance-associated Macrophage Protein 1," *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 2, pp. 351-364, 1998.
- [7] J. M. Blackwell, T. Goswami, A. Carlton, W. Evans, D. Sibthorpe, N. Papo, K. White, S. Searle, E. N. Miller, S. Peacock, H. Mohammed, and M. Ibrahim, "SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance," *Cell. Microbiol.*, vol. 3, pp. 773-784, 2001.
- [8] J. D. Ernst, "The immunological life cycle of tuberculosis.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 8, pp. 581-591, Aug. 2012.
- [9] L. Ramakrishnan, "Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 5, pp. 352-366, May 2012.
- [10] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, "Pathogen recognition and innate immunity.," *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783-801, Feb. 2006.
- [11] B. W. Jones, T. K. Means, K. A. Heldwein, M. A. Keen, P. J. Hill, J. T. Belisle, and M. J. Fenton, "Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 69, pp. 1036-1044, 2001.
- [12] T. K. Means, B. W. Jones, a B. Schromm, B. a Shurtleff, J. a Smith, J. Keane, D. T. Golenbock, S. N. Vogel, and M. J. Fenton, "Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-

induced macrophage responses.," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 6, pp. 4074–4082, Mar. 2001.

- [13] S. Thoma-Uszynski, S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. a Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin, "Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors.," *Science (80-.)*, vol. 291, no. 5508, pp. 1544–1547, Feb. 2001.
- [14] Y. Bulut, K. S. Michelsen, L. Hayrapetian, Y. Naiki, R. Spallek, M. Singh, and M. Arditi, "Mycobacterium tuberculosis heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 22, pp. 20961–20967, Jun. 2005.
- [15] K. Ohashi, V. Burkart, S. Flohé, and H. Kolb, "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 2, pp. 558–561, Jan. 2000.
- [16] A. Bafica, C. a Scanga, C. G. Feng, C. Leifer, A. Cheever, and A. Sher, "TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis.," *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 12, pp. 1715–1724, Dec. 2005.
- [17] L. Pompei, S. Jang, B. Zamlynny, S. Ravikumar, A. McBride, S. P. Hickman, and P. Salgame, "Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis is due to use of distinct TLRs.," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 8, pp. 5192–5199, Apr. 2007.
- [18] Y. Zhong, A. Kinio, and M. Saleh, "Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases.," *Front. Immunol.*, vol. 4, no. October, p. 333, Jan. 2013.
- [19] F. Coulombe, M. Divangahi, F. Veyrier, L. de Léséleuc, J. L. Gleason, Y. Yang, M. a Kelliher, A. K. Pandey, C. M. Sasseti, M. B. Reed, and M. a Behr, "Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide.," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 8, pp. 1709–1716, Aug. 2009.
- [20] G. Ferwerda, S. E. Girardin, B.-J. Kullberg, L. Le Bourhis, D. J. de Jong, D. M. L. Langenberg, R. van Crevel, G. J. Adema, T. H. M. Ottenhoff, J. W. M. Van der Meer, and M. G. Netea, "NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis.," *PLoS Pathog.*, vol. 1, no. 3, pp. 279–285, Nov. 2005.
- [21] J. Nigou, C. Zelle-Rieser, M. Gilleron, M. Thurnher, and G. Puzo, "Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human

dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor.," *J. Immunol.*, vol. 166, no. 12, pp. 7477–7485, Jun. 2001.

- [22] M. B. Reed, P. Domenech, C. Manca, H. Su, A. K. Barczak, B. N. Kreiswirth, G. Kaplan, and C. E. Barry, "A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response.," *Nature*, vol. 431, no. 7004, pp. 84–87, Sep. 2004.
- [23] J. B. Torrelles and L. S. Schlesinger, "Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host.," *Tuberculosis*, vol. 90, no. 2, pp. 84–93, Mar. 2010.
- [24] T. B. H. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, E. a. Koppel, M. Sanchez-Hernandez, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, B. Appelmelk, and Y. van Kooyk, "Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 1, pp. 7–17, Dec. 2002.
- [25] J. Geurtsen, S. Chedammi, J. Mesters, M. Cot, N. N. Driessen, T. Sambou, R. Kakutani, R. Ummels, J. Maaskant, H. Takata, O. Baba, T. Terashima, N. Bovin, C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls, J. Nigou, G. Puzo, A. Lemassu, M. Daffé, and B. J. Appelmelk, "Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation.," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 8, pp. 5221–5231, Oct. 2009.
- [26] M. Yadav and J. S. Schorey, "The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria.," *Blood*, vol. 108, no. 9, pp. 3168–3175, Nov. 2006.
- [27] F. L. van de Veerdonk, A. C. Teirlinck, J. Kleinnijenhuis, B. J. Kullberg, R. van Crevel, J. W. M. van der Meer, L. a B. Joosten, and M. G. Netea, "Mycobacterium tuberculosis induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 88, no. 2, pp. 227–232, Aug. 2010.
- [28] T. Kawai and S. Akira, "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.," *Immunity*, vol. 34, no. 5, pp. 637–50, May 2011.
- [29] T. Seya and K. Miyake, "Toll-like Receptors," *Encycl. Life Sci.*, pp. 1–12, 2009.
- [30] S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, "Pathogen recognition and innate immunity.," *Cell*, vol. 124, no. 4, pp. 783–801, Feb. 2006.

- [31] R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto, "MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 11, pp. 1777–82, Jun. 1999.
- [32] U. Hasan, C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guiet, F. Brière, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri, and E. E. M. Bates, "Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88.," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 5, pp. 2942–50, Mar. 2005.
- [33] R. G. Govindaraj, B. Manavalan, G. Lee, and S. Choi, "Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling.," *PLoS One*, vol. 5, no. 9, p. e12713, Jan. 2010.
- [34] J. Brown, H. Wang, G. N. Hajishengallis, and M. Martin, "TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk.," *J. Dent. Res.*, vol. 90, no. 4, pp. 417–427, May 2011.
- [35] M. Guilliams, P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad, and B. N. Lambrecht, "The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 2, pp. 94–108, Feb. 2014.
- [36] P. Boross, "Fc Receptors," *Encycl. Life Sci.*, no. September, 2008.
- [37] S. Bournazos, J. M. Woof, S. P. Hart, and I. Dransfield, "Functional and clinical consequences of Fc receptor polymorphic and copy number variants," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 157, no. 2, pp. 244–254, Aug. 2009.
- [38] B. K. Flesch and J. Neppert, "Functions of the Fc receptors for immunoglobulin G," *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 14, no. 4, pp. 141–56, Jan. 2000.
- [39] P. J. Maglione, J. Xu, a. Casadevall, and J. Chan, "Fc Receptors Regulate Immune Activation and Susceptibility during Mycobacterium tuberculosis Infection," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 5, pp. 3329–3338, Feb. 2008.
- [40] N. Joller, S. S. Weber, A. J. Müller, R. Spörri, P. Selchow, P. Sander, H. Hilbi, and A. Oxenius, "Antibodies protect against intracellular bacteria by Fc receptor-mediated lysosomal targeting," *PNAS*, vol. 107, no. 47, pp. 20441–20446, Nov. 2010.
- [41] N. Joller, S. S. Weber, and A. Oxenius, "Antibody-Fc receptor interactions in protection against intracellular pathogens," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, pp. 889–897, Apr. 2011.

- [42] "A 38-kDa Antigen of Mycobacterium tuberculosis Induces the Secretion of Interleukin-2, Interferon-gamma and IgG2a Antibodies," *Microbiol. Immunol.*, vol. 39, no. 10, pp. 801–808, 1995.
- [43] Y. Xue, Z. Q. Zhao, H. J. Wang, L. Jin, C. P. Liu, Y. Wang, and J. C. Li, "Toll-like receptors 2 and 4 gene polymorphisms in a southeastern Chinese population with tuberculosis.," *Int. J. Immunogenet.*, vol. 37, no. 2, pp. 135–8, Apr. 2010.
- [44] Y.-T. Lin, A. Verma, and C. P. Hodgkinson, "Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms.," *Curr. Genomics*, vol. 13, no. 8, pp. 633–45, Dec. 2012.
- [45] a. C. Ogus, B. Yoldas, T. Ozdemir, a. Uguz, S. Olcen, I. Keser, M. Coskun, a. Cilli, and O. Yegin, "The Arg753Gln polymorphism of the human Toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease," *Eur. Respir. J.*, vol. 23, no. 2, pp. 219–223, Feb. 2004.
- [46] D. R. Velez, C. Wejse, M. E. Stryjewski, E. Abbate, F. William, J. L. Myers, R. Estevan, S. G. Patillo, R. Olesen, G. Sirugo, J. R. Gilbert, C. D. Hamilton, and K. William, "Variants in toll-like receptors 2 and 9 influence susceptibility to pulmonary tuberculosis in Caucasians, African-Americans, and West Africans," *Hum. Genet.*, vol. 127, no. 1, pp. 65–73, 2011.
- [47] X. Ma, Y. Liu, B. B. Gowen, E. a Graviss, A. G. Clark, and J. M. Musser, "Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease," *PLoS One*, vol. 2, no. 12, p. e1318, Jan. 2007.
- [48] M. S. Shey, a K. Randhawa, M. Bowmaker, E. Smith, T. J. Scriba, M. de Kock, H. Mahomed, G. Hussey, T. R. Hawn, and W. a Hanekom, "Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide- and mycobacteria-induced interleukin-6 secretion," *Genes Immun.*, vol. 11, no. 7, pp. 561–72, Oct. 2010.
- [49] S. Davila, M. L. Hibberd, R. Hari Dass, H. E. E. Wong, E. Sahiratmadja, C. Bonnard, B. Alisjahbana, J. S. Szeszko, Y. Balabanova, F. Drobniowski, R. van Crevel, E. van de Vosse, S. Nejentsev, T. H. M. Ottenhoff, and M. Seielstad, "Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis.," *PLoS Genet.*, vol. 4, no. 10, p. e1000218, Oct. 2008.
- [50] P. Selvaraj, M. Harishankar, B. Singh, M. S. Jawahar, and V. V Banurekha, "Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India," *Tuberculosis*, vol. 90, pp. 306–310, Sep. 2010.

- [51] P. Georgel, C. Macquin, and S. Bahram, "The heterogeneous allelic repertoire of human toll-like receptor (TLR) genes," *PLoS One*, vol. 4, no. 11, p. e7803, Jan. 2009.
- [52] M. J. Newport, A. Allen, a a Awomoyi, S. J. Dunstan, E. McKinney, A. Marchant, and G. Sirugo, "The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant: no influence on LPS responsiveness or susceptibility to pulmonary tuberculosis in The Gambia.," *Tuberculosis*, vol. 84, pp. 347–52, Jan. 2004.
- [53] H. M. S. Asai, Y. Abe, T. Fujino, A. Masukawa, S. Arami, H. Furuyai, "Association of the SLC11A1 Gene Polymorphisms With Susceptibility to Mycobacterium Infections in a Japanese Population," *Infect. Diseases Clin. Pract.*, vol. 16, no. 4, pp. 230–234, 2008.
- [54] M. Möller, E. de Wit, and E. G. Hoal, "Past, present and future directions in human genetic susceptibility to tuberculosis.," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 58, no. 1, pp. 3–26, Feb. 2010.
- [55] S. L. Fernando and W. J. Britton, "Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 84, pp. 125–37, Apr. 2006.
- [56] W. Ben-Selma, H. Harizi, and J. Boukadida, "Association of TNF- α and IL-10 polymorphisms with tuberculosis in Tunisian populations," *Microbes Infect.*, pp. 1–7, Sep. 2011.
- [57] A. Duits, H. Bootsma, R. Derksen, P. Spronk, L. Kater, C. Kallenberg, P. Capel, N. Westerdal, G. Spierenburg, and F. Gmelig-Meyling, "Skewed distribution of IgG Fc receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with renal disease in systemic lupus erythematosus patients," *Arthritis Reum.*, vol. 12, pp. 1832–1836, 1995.
- [58] S. Sinha, S. K. Mishra, S. Sharma, P. K. Patibandla, P. K. Mallick, S. K. Sharma, S. Mohanty, S. S. Pati, S. K. Mishra, B. K. Ramteke, R. Bhatt, H. Joshi, A. P. Dash, R. C. Ahuja, S. Awasthi, V. Venkatesh, and S. Habib, "Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for Fc γ RIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population," *Malar. J.*, vol. 7, p. 13, Jan. 2008.
- [59] X. Li, T. S. Ptacek, E. E. Brown, and J. C. Edberg, "Fc γ Receptors: Structure, Function and Role as Genetic Risk Factors in SLE," *Genes Immun.*, vol. 10, no. 5, pp. 380–389, 2009.
- [60] M. Noreen, M. A. a Shah, S. M. Mall, S. Choudhary, T. Hussain, I. Ahmed, S. F. Jalil, and M. I. Raza, "TLR4 polymorphisms and disease susceptibility," *Inflamm. Res.*, vol. 61, pp. 177–188, Mar. 2012.

- [61] D. Sánchez, C. Lefebvre, J. Rioux, L. F. García, and L. F. Barrera, "Evaluation of Toll-like receptor and adaptor molecule polymorphisms for susceptibility to tuberculosis in a Colombian population," *Int. J. Immunogenet.*, vol. 39, pp. 216–223, Jun. 2012.
- [62] T. R. Hawn, A. Verbon, M. Janer, L. P. Zhao, B. Beutler, and A. Aderem, "Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease," *PNAS*, vol. 102, no. 7, pp. 2487–2489, Feb. 2005.
- [63] S. H. E. Kaufmann, "Tuberculosis Deadly combination," *Nat. News Views*, vol. 453, pp. 295–296, 2008.
- [64] A. K. Azad, W. Sadee, and L. S. Schlesinger, "Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis.," *Infect. Immun.*, vol. 80, no. 10, pp. 3343–59, Oct. 2012.
- [65] A. C. Iliadi, P. C. Ioannou, J. Traeger-Synodinos, E. Kanavakis, and T. K. Christopoulos, "High-throughput microtiter well-based bioluminometric genotyping of two single-nucleotide polymorphisms in the toll-like receptor-4 gene," *Anal. Biochem.*, vol. 376, no. 2, pp. 235–241, May 2008.
- [66] P.-Y. Bochud, J. W. Chien, K. a Marr, W. M. Leisenring, A. Upton, M. Janer, S. D. Rodrigues, S. Li, J. a Hansen, L. P. Zhao, A. Aderem, and M. Boeckh, "Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation," *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 17, pp. 1766–77, Oct. 2008.
- [67] B. a Raby, W. T. Klimecki, C. Laprise, Y. Renaud, J. Faith, M. Lemire, C. Greenwood, K. M. Weiland, C. Lange, L. J. Palmer, R. Lazarus, D. Vercelli, D. J. Kwiatkowski, E. K. Silverman, F. D. Martinez, T. J. Hudson, and S. T. Weiss, "Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 166, pp. 1449–1456, Dec. 2002.
- [68] D. Jahantigh, S. Salimi, R. Alavi-Naini, A. Emamdadi, H. Owaysee Osquee, and F. Farajian Mashhadi, "Association between TLR4 and TLR9 gene polymorphisms with development of pulmonary tuberculosis in Zahedan, southeastern Iran.," *Sci. World J.*, vol. 2013, pp. 1–7, Jan. 2013.
- [69] A. G. Rosas-Taraco, A. Revol, M. C. Salinas-Carmona, A. Rendon, G. Caballero-Olin, and A. Y. Arce-Mendoza, "CD14 C(-159)T polymorphism is a risk factor for development of pulmonary tuberculosis.," *J. Infect. Dis.*, vol. 196, no. 11, pp. 1698–706, Dec. 2007.

- [70] D. Torres-García, A. Cruz-Lagunas, M. C. García-Sancho Figueroa, R. Fernández-Plata, R. Baez-Saldaña, C. Mendoza-Milla, R. Barquera, A. Carrera-Eusebio, S. Ramírez-Bravo, L. Campos, J. Angeles, G. Vargas-Alarcón, J. Granados, R. Gopal, S. a Khader, E. J. Yunis, and J. Zuñiga, "Variants in toll-like receptor 9 gene influence susceptibility to tuberculosis in a Mexican population.," *J. Transl. Med.*, vol. 11, p. 220, Sep. 2013.
- [71] M. A. Horwitz and S. C. Silverstein, "Legionnaires ' Disease Bacterium (*Legionella pneumophila*) Multiplies Intracellularly in Human Monocytes," *J. Clin. Invest.*, vol. 66, pp. 441–450, 1980.
- [72] L. Figueroa, Y. Xiong, C. Song, W. Piao, S. N. Vogel, and A. E. Medvedev, "The Asp299Gly polymorphism alters TLR4 signaling by interfering with recruitment of MyD88 and TRIF," *J. Immunol.*, vol. 188, pp. 4506–4515, May 2012.
- [73] N. Yamakawa, U. Ohto, S. Akashi-Takamura, K. Takahashi, S.-I. Saitoh, N. Tanimura, T. Suganami, Y. Ogawa, T. Shibata, T. Shimizu, and K. Miyake, "Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A," *Int. Immunol.*, Jan. 2012.
- [74] X. Bai, N. E. Feldman, K. Chmura, A. R. Ovrutsky, W.-L. Su, L. Griffin, D. Pyeon, M. T. McGibney, M. J. Strand, M. Numata, S. Murakami, L. Gaido, J. R. Honda, W. H. Kinney, R. E. Oberley-Deegan, D. R. Voelker, D. J. Ordway, and E. D. Chan, "Inhibition of nuclear factor-kappa B activation decreases survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e61925, Jan. 2013.
- [75] Y. Xiong, C. Song, G. a Snyder, E. J. Sundberg, and A. E. Medvedev, "R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 45, pp. 38327–37, Nov. 2012.
- [76] M. S. Shey, a K. Randhawa, M. Bowmaker, E. Smith, T. J. Scriba, M. de Kock, H. Mahomed, G. Hussey, T. R. Hawn, and W. a Hanekom, "Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide- and mycobacteria-induced interleukin-6 secretion.," *Genes Immun.*, vol. 11, no. 7, pp. 561–572, Oct. 2010.
- [77] H. a Niederer, L. C. Willcocks, T. F. Rayner, W. Yang, Y. L. Lau, T. N. Williams, J. A. G. Scott, B. C. Urban, N. Peshu, S. J. Dunstan, T. T. Hien, N. H. Phu, L. Padyukov, I. Gunnarsson, E. Svenungsson, C. O. Savage, R. a Watts, P. a Lyons, D. G. Clayton, and K. G. C. Smith, "Copy number,

linkage disequilibrium and disease association in the FCGR locus.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. 16, pp. 3282–94, Aug. 2010.

- [78] K. Sadki, H. Lamsyah, B. Rueda, E. Akil, A. Sadak, J. Martin, and R. El Aouad, "Analysis of MIF, FCGR2A and FCGR3A gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Moroccan population," *J. Genet. genomics*, vol. 37, pp. 257–264, Apr. 2010.
- [79] G. G. de la T. M. Gómez-Gómez, C. Danglot-Banck, S. G. Huerta Alvarado, "El estudio de casos y controles: su diseño, análisis e interpretación, en investigación clínica," *Rev. Mex. Pediatr.*, vol. 70, no. 5, pp. 257–263, 2003.
- [80] C. M. Lewis, "Genetic association studies: design, analysis and interpretation.," *Brief. Bioinform.*, vol. 3, no. 2, pp. 146–153, Jun. 2002.